



PCT

特許協力条約に基づいて公開された国際出願

<p>(51) 国際特許分類7 C07K 14/78, 5/068, 7/04, C12N 15/00, A61K 38/10, 38/08, 9/127</p>	<p>A1</p>	<p>(11) 国際公開番号 WO00/23476</p> <p>(43) 国際公開日 2000年4月27日(27.04.00)</p>													
<table border="1"> <tr> <td data-bbox="131 428 730 472"> <p>(21) 国際出願番号 PCT/JP99/05730</p> </td> <td data-bbox="730 428 1331 472"> <p>田中理紀(TANAKA, Michinori)[JP/JP] 〒771-1265 徳島県板野郡藍住町住吉千鳥ヶ浜42-13 Tokushima, (JP)</p> </td> </tr> <tr> <td data-bbox="131 472 730 514"> <p>(22) 国際出願日 1999年10月15日(15.10.99)</p> </td> <td data-bbox="730 472 1331 514"> <p>瀧 孝雄(TAKI, Takao)[JP/JP] 〒771-0204 徳島県板野郡北島町鯛浜字西ノ須51-24 Tokushima, (JP)</p> </td> </tr> <tr> <td data-bbox="131 514 730 556"> <p>(30) 優先権データ</p> </td> <td data-bbox="730 514 1331 556"> <p>(74) 代理人</p> </td> </tr> <tr> <td data-bbox="131 556 730 598"> <p>特願平10/295198 1998年10月16日(16.10.98) JP</p> </td> <td data-bbox="730 556 1331 598"> <p>三枝英二, 外(SAEGUSA, Eiji et al.) 〒541-0045 大阪府大阪市中央区道修町1-7-1 北浜TNKビル Osaka, (JP)</p> </td> </tr> <tr> <td data-bbox="131 598 730 640"> <p>特願平11/194706 1999年7月8日(08.07.99) JP</p> </td> <td data-bbox="730 598 1331 640"> <p>(81) 指定国 CA, JP, US, 欧州特許 (AT, BE, CH, CY, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE)</p> </td> </tr> <tr> <td colspan="2" data-bbox="131 640 730 1071"> <p>(71) 出願人 (米国を除くすべての指定国について) 大塚製薬株式会社 (OTSUKA PHARMACEUTICAL CO., LTD.)(JP/JP) 〒101-8535 東京都千代田区神田司町2丁目9番地 Tokyo, (JP)</p> <p>(72) 発明者; および (75) 発明者/出願人 (米国についてのみ) 奥 直人(OKU, Naoto)[JP/JP] 〒424-0857 静岡県清水市川原町21-11-302 Sizuoka, (P)</p> <p>荻野晃一(OGINO, Koichi)[JP/JP] 〒772-0003 徳島県鳴門市撫養町南浜字東浜197-3 Tokushima, (JP)</p> <p>石川 大(ISHIKAWA, Dai)[JP/JP] 〒770-0002 徳島県徳島市春日3-1-7-102 Tokushima, (JP)</p> </td> <td data-bbox="730 640 1331 1071"> <p>添付公開書類 国際調査報告書</p> </td> </tr> </table>			<p>(21) 国際出願番号 PCT/JP99/05730</p>	<p>田中理紀(TANAKA, Michinori)[JP/JP] 〒771-1265 徳島県板野郡藍住町住吉千鳥ヶ浜42-13 Tokushima, (JP)</p>	<p>(22) 国際出願日 1999年10月15日(15.10.99)</p>	<p>瀧 孝雄(TAKI, Takao)[JP/JP] 〒771-0204 徳島県板野郡北島町鯛浜字西ノ須51-24 Tokushima, (JP)</p>	<p>(30) 優先権データ</p>	<p>(74) 代理人</p>	<p>特願平10/295198 1998年10月16日(16.10.98) JP</p>	<p>三枝英二, 外(SAEGUSA, Eiji et al.) 〒541-0045 大阪府大阪市中央区道修町1-7-1 北浜TNKビル Osaka, (JP)</p>	<p>特願平11/194706 1999年7月8日(08.07.99) JP</p>	<p>(81) 指定国 CA, JP, US, 欧州特許 (AT, BE, CH, CY, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE)</p>	<p>(71) 出願人 (米国を除くすべての指定国について) 大塚製薬株式会社 (OTSUKA PHARMACEUTICAL CO., LTD.)(JP/JP) 〒101-8535 東京都千代田区神田司町2丁目9番地 Tokyo, (JP)</p> <p>(72) 発明者; および (75) 発明者/出願人 (米国についてのみ) 奥 直人(OKU, Naoto)[JP/JP] 〒424-0857 静岡県清水市川原町21-11-302 Sizuoka, (P)</p> <p>荻野晃一(OGINO, Koichi)[JP/JP] 〒772-0003 徳島県鳴門市撫養町南浜字東浜197-3 Tokushima, (JP)</p> <p>石川 大(ISHIKAWA, Dai)[JP/JP] 〒770-0002 徳島県徳島市春日3-1-7-102 Tokushima, (JP)</p>		<p>添付公開書類 国際調査報告書</p>
<p>(21) 国際出願番号 PCT/JP99/05730</p>	<p>田中理紀(TANAKA, Michinori)[JP/JP] 〒771-1265 徳島県板野郡藍住町住吉千鳥ヶ浜42-13 Tokushima, (JP)</p>														
<p>(22) 国際出願日 1999年10月15日(15.10.99)</p>	<p>瀧 孝雄(TAKI, Takao)[JP/JP] 〒771-0204 徳島県板野郡北島町鯛浜字西ノ須51-24 Tokushima, (JP)</p>														
<p>(30) 優先権データ</p>	<p>(74) 代理人</p>														
<p>特願平10/295198 1998年10月16日(16.10.98) JP</p>	<p>三枝英二, 外(SAEGUSA, Eiji et al.) 〒541-0045 大阪府大阪市中央区道修町1-7-1 北浜TNKビル Osaka, (JP)</p>														
<p>特願平11/194706 1999年7月8日(08.07.99) JP</p>	<p>(81) 指定国 CA, JP, US, 欧州特許 (AT, BE, CH, CY, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE)</p>														
<p>(71) 出願人 (米国を除くすべての指定国について) 大塚製薬株式会社 (OTSUKA PHARMACEUTICAL CO., LTD.)(JP/JP) 〒101-8535 東京都千代田区神田司町2丁目9番地 Tokyo, (JP)</p> <p>(72) 発明者; および (75) 発明者/出願人 (米国についてのみ) 奥 直人(OKU, Naoto)[JP/JP] 〒424-0857 静岡県清水市川原町21-11-302 Sizuoka, (P)</p> <p>荻野晃一(OGINO, Koichi)[JP/JP] 〒772-0003 徳島県鳴門市撫養町南浜字東浜197-3 Tokushima, (JP)</p> <p>石川 大(ISHIKAWA, Dai)[JP/JP] 〒770-0002 徳島県徳島市春日3-1-7-102 Tokushima, (JP)</p>		<p>添付公開書類 国際調査報告書</p>													
<p>(54)Title: NEOVASCULAR-SPECIFIC PEPTIDES</p> <p>(54)発明の名称 新生血管特異的ペプチド</p> <p>(57) Abstract Neovascular-specific peptides which include, for example, peptides having the amino acid sequences represented by SEQ ID NOS: 1 to 17 and dendrimers thereof. These peptides are applicable to DDS preparations whereby drugs can be delivered selectively to target cancer tissues. Thus these peptides are useful as diagnostics for cancer, remedies for cancer, etc. which contribute to the improvement in the therapeutic effects on cancer.</p>															

(57)要約

本発明によれば、例えば配列番号1～17に示されるアミノ酸配列のペプチドまたはそのデンドリマーである血管新生特異的ペプチドが提供され、之等は標的癌組織に選択的に薬物送達を可能とするDDS製剤への応用が可能で、癌治療効果の向上に寄与する癌診断剤、癌治療剤等として有用である。

PCTに基づいて公開される国際出願のパンフレット第一頁に掲載されたPCT加盟国を同定するために使用されるコード(参考情報)

AE アラブ首長国連邦	DM ドミニカ	KZ カザフスタン	RU ロシア
AL アルバニア	EE エストニア	LC セントルシア	SD スーダン
AM アルメニア	ES スペイン	LI リヒテンシュタイン	SE スウェーデン
AT オーストリア	FI フィンランド	LK スリ・ランカ	SG シンガポール
AU オーストラリア	FR フランス	LR リベリア	SI スロヴェニア
AZ アゼルバイジャン	GA ガボン	LS レソト	SK スロヴァキア
BA ボスニア・ヘルツェゴビナ	GB 英国	LT リトアニア	SL シェラ・レオネ
BB バルバドス	GD グレナダ	LU ルクセンブルグ	SN セネガル
BE ベルギー	GE グルジア	LV ラトヴィア	SR スリランダ
BF ブルキナ・ファソ	GH ガーナ	MA モロッコ	SZ スワジランド
BG ブルガリア	GM ガンビア	MC モナコ	TD チャード
BJ ベナン	GN ギニア	MD モルドヴァ	TG トーゴ
BR ブラジル	GW ギニア・ビサウ	MG マダガスカル	TJ タジキスタン
BY ベラルーシ	GR ギリシャ	MK マケドニア	TZ タンザニア
CA カナダ	HR クロアチア	ML マリ	TM トルクメニスタン
CF 中央アフリカ	HU ハンガリー	MN モンゴル	TR トリニダード・トバゴ
CG コンゴ	ID インドネシア	MR モーリタニア	UA ウクライナ
CH スイス	IE アイルランド	MW マラウイ	UG ウガンダ
CJ コートジボアール	IL イスラエル	MX メキシコ	US 米国
CM カメルーン	IN インド	NE ニジェール	UZ ウズベキスタン
CN 中国	IS アイスランド	NL オランダ	VN ヴィエトナム
CR コスタ・リカ	IT イタリア	NO ノルウェー	YU ユーゴスラビア
CU キューバ	JP 日本	NZ ニュー・ジーランド	ZA 南アフリカ共和国
CY キプロス	KE ケニア	PL ポーランド	ZW ジンバブエ
CZ チェッコ	KG キルギスタン	PT ポルトガル	
DE ドイツ	KP 北朝鮮	RO ルーマニア	
DK デンマーク	KR 韓国		

## 明 細 書

### 新生血管特異的ペプチド

#### 技 術 分 野

本発明は、新生血管に選択的に帰巢するペプチド分子、  
5 より詳しくは例えば癌組織の新生血管内皮細胞に対する  
リガンドとして機能し、分子医薬として有用であり、標  
的組織に選択的に薬物送達を可能とするドラッグ デリバ  
リー システム (DDS) 製剤に応用可能であり、癌治療  
効果の向上に寄与できる、新生血管特異的ペプチドに関  
10 する。

#### 背 景 技 術

癌化学療法を困難にしている一因としては、投与され  
た薬物が標的とする癌組織のみならず正常組織まで殺傷  
し、副作用を引き起こすことが挙げられる。かかる副作  
15 用の軽減や、抗癌剤の薬効の向上を実現するものとして、  
癌治療の分野においては、ドラッグ デリバリー システ  
ム (DDS: Drug Delivery System) が注目を集めている。

癌を標的とした上記DDSは、パッシブターゲティン  
グによるものと、アクティブターゲティングによるもの  
20 の2種類に大別される。新生血管は既存の血管に比べて  
血管透過性が亢進しているため、長期血中滞留型の製剤  
は、徐々に癌組織に集積する。その性質を利用したター

ゲティングが、パッシブターゲティングであり、欧米では既にリポソームを用いたパッシブターゲティング製剤が、カボジ肉腫の治療に使用されている。一方、アクティブターゲティング製剤は、癌細胞やその周辺組織に高  
5 発現する蛋白などの細胞表面マーカーに結合する抗体やその他のリガンドにて薬剤を修飾し、正常組織に有害な影響を与えず、癌組織に積極的且つ選択的に薬剤を送達できるように設計した製剤である。

また、現在の癌治療分野においては、血管新生が注目  
10 されている。この血管新生とは、癌が成長する過程において、癌の成長に伴って癌組織内部の血管も同時に発達することをいう。即ち、癌細胞の活発な増殖、癌組織の成長、転移が起こるためには、栄養分、酸素の供給、代謝老廃物の排泄を行う器官である血管が新たに構築され  
15 ることが重要であり、この点で、癌組織の成長は、血管新生に大きく依存しているといえる。

この血管新生を抑制すれば、癌組織の成長、転移を抑制できると考えられ、このことから、新生血管を標的とした癌の治療法、特に新生血管を標的とするアクティブ  
20 ターゲティング製剤（DDS製剤）の開発が当業界で所望されている。

上記癌組織の新生血管内皮細胞に対してリガンドとなる物質を同定、単離、提供できれば、これはDDS製剤への応用および癌治療効果の更なる向上が期待できる。

本発明は、かかる新たなリガンドを提供することを目的としている。また本発明は、血管新生を抑制する物質を提供することをも目的としている。

本発明者らは、上記目的より鋭意研究を重ねる過程において以下の知見を得た。即ちまず本発明者らは、チャンパーリング法(Folkman, J., et al., J. Exp. Med., 133, 275-288 (1971))により、マウス背部に腫瘍新生血管を誘導形成させた後、ファージのコートタンパク質pIII遺伝子にランダムなDNAを挿入して、ファージ外殻表面にランダムな15アミノ酸配列のペプチドを発現し得るように構築したランダムペプチドディスプレイファージを上記マウスに投与し、その後、該マウスを液体窒素で凍結し、新生血管のできた皮膚を切り取り、蛋白分解酵素阻害剤含有培養液中にてホモジナイズし、洗浄・遠心分離後、新生血管からファージを回収し、これを大腸菌に感染させて大量培養し、分離、精製して、新生血管内皮に集積したリガンドとなるペプチド発現ファージを得た。かくして得られた複数個のファージについて、それらの発現するペプチドの配列決定を行った。

ついで、新生血管に親和性の高いペプチド発現ファージを選択するために、上記で得られた各ファージを、癌細胞を移植した担癌マウスの尾静脈内に投与し、上記と同様にマウスを液体窒素で凍結し、癌組織を切除摘出し、  
5 得られた材料からファージを分離精製し、大腸菌に感染させ、培養した。そして、ファージのコロニー形成単位を選別前のファージをコントロールとして測定し、新生血管に対する親和性を、癌組織 100 mg あたりにおける、尾静脈内に投与したファージ数に対する集積ファージ数の比として算出し、かくして、新生血管に対する親  
10 和性の高いリガンドとしての候補ペプチドを得た。

更に、本発明者らは、上記ペプチド、上記ペプチドのデンドリマー(dendrimer)、上記ペプチドの部分ペプチドなどを合成し、これらが実際に抗腫瘍効果を奏すること  
15 を確認すると共に、上記ペプチド、特にTrp-Arg-Pro配列およびPro-Arg-Pro配列を含むペプチドで修飾したりボソームの腫瘍内分布がコントロールに比べて有意に高いことを確認した。

本発明は、これらの知見に基づいて完成されたもので  
20 ある。

本発明によれば、新生血管に選択的に帰巢し、以下の  
(a)および(b)のいずれかである新生血管特異的ペプチド

が提供される。

(a) 配列番号 1 から 11 で示されるアミノ酸配列のいずれかを有するペプチドまたはそのデンドリマー、

(b) 上記 (a) に示されるアミノ酸配列において 1 若しくは  
5 複数個のアミノ酸が置換、欠失若しくは付加されたアミノ酸配列からなり、かつ新生血管に親和性を有するペプチドまたはそのデンドリマー。

特に、本発明によれば、配列番号 1 から 11 で示されるアミノ酸配列のいずれかを有するペプチドまたはその  
10 デンドリマーである上記新生血管特異的ペプチド；より好ましくは、配列番号 1、5 および 6 で示されるアミノ酸配列のいずれかを有するペプチドまたはそのデンドリマーである上記新生血管特異的ペプチド；配列番号 1 ～  
11 で示されるアミノ酸配列のペプチドの同一または異なる複数個を含むデンドリマーである上記新生血管特異的ペプチド；配列番号 12 ～ 17 で示されるアミノ酸配列のいずれかを有するペプチドまたはそのデンドリマーである上記新生血管特異的ペプチド；および配列番号  
19、21、23 ～ 25 および 28 ～ 32 で示されるア  
20 ミノ酸配列のいずれかを有するペプチドまたはそのデンドリマーである上記新生血管特異的ペプチドが提供される。

また、本発明によれば、癌組織、例えば肉腫またはメラノーマに形成される新生血管に選択的に帰巢するペプチドである上記新生血管特異的ペプチドが提供される。

更に、本発明によれば、上記新生血管特異的ペプチド  
5 の少なくとも1種、好ましくは、配列番号1、5、6、  
13～17、19、21、23～25 および28～32  
で示されるアミノ酸配列のいずれかを有するペプチドまたはそのデンドリマーの少なくとも1種を有効成分とし、  
これを製剤担体と共に含有する制癌組成物および癌転移  
10 抑制組成物が提供される。

更に、本発明によれば、上記新生血管特異的ペプチド  
の少なくとも1種、好ましくは、配列番号15～17で  
示されるアミノ酸配列のいずれかを有するペプチドまたは  
はそのデンドリマーの少なくとも1種と、抗癌剤または  
15 癌転移抑制剤とを有効成分とし、これを製剤担体と共に  
含有するリボソーム製剤が提供される。

更に、本発明によれば、上記新生血管特異的ペプチド  
の少なくとも1種の有効量を患者に投与する抗癌および  
癌転移抑制方法、特に配列番号1、5、6、13～17、  
20 19、21、23～25 および28～32で示されるア  
ミノ酸配列のいずれかを有するペプチドまたはそのデ  
ンドリマーの少なくとも1種の有効量を患者に投与する制



癌および癌転移抑制方法が提供される。

更に、本発明によれば、上記リポソーム製剤、好ましくは、配列番号 15 ~ 17 で示されるアミノ酸配列のいずれかを有するペプチドまたはそのデンドリマーの少なくとも 1 種と、抗癌剤または癌転移抑制剤とを有効成分とし、これを製剤担体と共に含有するリポソーム製剤を患者に投与する制癌および癌転移抑制方法が提供される。

以下、本明細書におけるアミノ酸、ペプチド、塩基配列、核酸等の略号による表示は、IUPAC、IUBの規定、「塩基配列又はアミノ酸配列を含む明細書等の作成のためのガイドライン」（特許庁編）および当該分野における慣用記号に従うものとする。

本発明新生血管特異的ペプチドの具体例としては、後述する実施例に示される方法により得られる配列番号 1 から 11 に示されるアミノ酸配列を有するものを例示できる。

以下、本発明新生血管特異的ペプチドの同定および新生血管への親和性につき詳述する。

本発明新生血管特異的ペプチドの同定には、分子ライブラリーのスクリーニング手法を採用でき、上記ライブラリーとしては、例えばファージディスプレイライブラリーを好ましく例示できる。かかるライブラリーは、市

- 販のものを用いることができる。該ライブラリー中のランダムペプチドディスプレイファージは、標的とする分子または細胞に特異的に結合するペプチドを同定するために、特定の標的分子または目的の細胞を用いてインビ
- 5 トロでスクリーニングされ得る多数のペプチドを発現するのにも利用される。該ライブラリーを用いるスクリーニングは、種々の細胞表面レセプターと特異的に結合するリガンドや種々の抗体を同定するために使用される。これらファージディスプレイライブラリーの作成方法および
- 10 ビンビトロスクリーニング法については、スコットおよびスミスの方法が参照される (Scott, J. M. and Smith, G. P., *Science*, 249, 386-390 (1990); Smith, G. P. and Scott, J. K., *Methods in Enzymology*, 217, 228-257 (1993))。
- 15 本発明の新生血管に帰巢し得る分子としての新生血管特異的ペプチドの同定のために、より好ましく使用される方法としては、例えば特表平 10-502674 号公報 (対応米国特許第 5622699 号) に記載された、ルオスラーティらの器官または組織に帰巢する分子を同定
- 20 する方法が例示できる。該方法は潜在的な器官帰巢分子のライブラリーをスクリーニングするインビボパニングを用いることにより 1、2 または 3 の選択された器官ま

たは組織に特異的に帰巢する分子を同定する方法であり、次の如くして実施できる。

- 即ち、まず、公知のファージライブラリーにランダム DNA を導入した後、得られるファージライブラリーの
- 5 希釈混合物を、例えばマウスの尾静脈に投与し、1～4 分後に、マウスを液体窒素中で急速凍結する。ファージを回収するために、死体を解凍し、所望の器官または組織を採取し、蛋白分解酵素阻害剤を含む培養液中にてホモジナイズし、得られた試料を1%ウシ血清アルブミン
- 10 を含有する氷冷培養液で数回洗浄後、大腸菌に感染させる。ファージで感染された大腸菌をテトラサイクリンを含む培地中で数時間培養後、テトラサイクリンを含む寒天プレートにプレコートし、回収されたファージを含むコロニーを更に適当な培地中で培養して、ファ
- 15 ージを分離・精製する。そして2回目以降のバイオパニングを行う。この2回目以降のインピボパニングは、上記で得られたファージを用いて上記と同様にして行い得る。かくして、所望の選択されたファージによって発現されたペプチドをコードするDNAを得ることができる。
- 20 得られるDNAを配列決定することにより、所望の器官または組織に帰巢する分子を同定することができる。

上記DNAの配列決定は、当業界で公知の方法により

容易に行い得、例えばジデオキシ法〔Proc. Natl. Acad. Sci., USA., 74, 5463-5467 (1977)〕やマキシムーギルパート法〔Method in Enzymology, 65, 499 (1980)〕等により行うことができる。かかる塩基配列の決定は、市販のシークエンスキット等を用いても容易に行い得る。

また、器官または組織に帰巢する分子の親和性を検出する方法としては、例えば次の方法を採用することができる。即ち、前記器官または組織に特異的に帰巢する分子を同定する方法において、得られた器官または組織特異的ペプチド発現ファージおよび選別前のファージを実験動物の尾静脈内に投与し、前記と同様の方法でファージのコロニー形成単位を測定し、例えば標的器官または組織 100 mg 当たりにおける尾静脈内投与したファージ数に対する集積ファージ数の比を評価することにより、所望の器官または組織に帰巢する分子の親和性を検出することができる。

その他、例えば競合法によって、標的器官または組織帰巢ペプチドの一つを選択し、該ペプチドを合成し、高速液体クロマトグラフィー (HPLC) により精製した後、前記合成ペプチドと同一のペプチドを発現するファージを含む幾つかの標的器官または組織帰巢ペプチドファージの標的器官または組織への帰巢における影響を、

合成ペプチドとの同時投与によって調べることにより、ペプチドの帰巢特異性を確認することができる(特表平10-502674号：米国特許第6522699号参照)。

- 5 上記新生血管特異的ペプチドの同定および新生血管への親和性の検出法の詳細は、後記実施例に示すとおりである。後記実施例に示されるマウスにおいてインビボパニングを用いて同定された本発明新生血管特異的ペプチドは、ヒトまたは他の哺乳動物種における癌の新生血管
- 10 組織と結合し得る。また、マウスにおいて増殖された新生血管形成に存在する標的分子と結合する本発明ペプチドは、ヒトまたは他の哺乳動物体における癌の新生血管形成における対応する標的分子と結合し得る。更に、本発明ペプチドは、インビトロで患者から得られたサンプ
- 15 ルと特異的に結合し得る。これらのことより、本発明ペプチドがヒト患者の対応する分子と結合する能力を有することが確認できる。

癌組織内血管の形成は、増殖を支持する新しい血管の連続形成が起こることにより特徴づけられ、この点で一

20 般的な組織学的血管の形成とは区別されている(Folkman, Nat. Med., 1, 27-31 (1995); Rak, Anticancer Drugs, 6, 3-18(1995))。従って、インビボパニングによって同

定された新生血管に特異的に帰巢する本発明ペプチドは、癌に対する新生血管形成の抑制因子として使用し得る。

一方、新生血管に特異的に帰巢する本発明ペプチドは、正常で健全な器官または組織に対しては、有害作用を及ぼす可能性が低い。

また、本発明ペプチドは、癌細胞ではなく新生血管に帰巢することから、制癌剤のような薬剤耐性を獲得する可能性が低いと考えられる。

更に新生血管に特異的に帰巢する本発明ペプチドは、炎症性組織、再生または傷害組織に存在するような他のタイプの新生血管系を標的としても使用し得る。また、子宮組織においても新生血管形成が生じているので、本発明ペプチドは、かかる子宮組織との結合性をも有すると考えられ、子宮筋腫等の疾患に影響力を及ぼすことが予想できる。

上記の如くして同定、確認された本発明ペプチドは、配列番号 1 から 11 で特定されるものであり、これらはいずれも新生血管に帰巢する性質を有することにより特徴づけられる。

本発明ペプチドには、上記配列番号 1 から 11 で示されるアミノ酸配列を有するペプチドの他に、該アミノ酸配列において、1 若しくは複数個のアミノ酸が置換、欠

失若しくは付加により改変されたアミノ酸配列からなり  
且つ新生血管に親和性を有するペプチド、即ち新生血管  
に帰巢する性質を有するペプチドが包含される。

ここで、アミノ酸の「置換、欠失若しくは付加」の程  
5 度およびそれらの位置などは、改変された蛋白質が、配  
列番号 1 から 11 で示されるアミノ酸配列からなる新生  
血管特異的ペプチドと同様の性質を有する同効物であれ  
ば特に制限されない。上記アミノ酸配列の改変（変異）  
などは、天然において、例えば突然変異や翻訳後の修飾  
10 などにより生じることもあるが、天然由来の遺伝子に基  
づいて人為的に改変することもできる。本発明は、この  
ような改変・変異の原因および手段などを問わず、上記  
特性を有する全ての改変ペプチドを包含する。

また本発明ペプチドには、上記配列番号 1 から 11 で  
15 示されるアミノ酸配列を有するペプチドの相同物も包含  
される。該相同物には、配列番号 1 から 11 に示される  
アミノ酸配列のペプチドと同一活性を有する、哺乳動物  
の蛋白質、例えばヒト、ウマ、ヒツジ、ウシ、イヌ、サ  
ル、ネコ、クマや、ラット、ウサギなどのげっ歯類動物  
20 の蛋白質も包含される。

上記改変されたアミノ酸配列を有する本発明ペプチド  
の例としては、例えば配列番号 1、5 および 6 で示され

- る配列中に一部重複して存在する配列、例えば、  
Pro-Arg-ProおよびTrp-Arg-Proを残存させ、その他のアミノ酸配列部分のアミノ酸残基を他のアミノ酸残基に置換したり、欠失させたり、他のアミノ酸残基を付加した  
5 ものや、配列番号2に示すアミノ酸配列において、2番目および8番目のアミノ酸残基を他のアミノ酸残基に置換したものや、配列番号11において4～11番目のアミノ酸配列部分のみを残存させ、他を欠失させたものを例示できる。
- 10 上記アミノ酸配列の一部を改変させた本発明ペプチドの具体例としては、例えば配列番号19に示される12アミノ酸残基からなるもの；配列番号12～14および21に示される8アミノ酸残基からなるもの；配列番号15～17および23～25に示す5アミノ酸残基から  
15 なるもの；配列番号28～31に示される4アミノ酸残基からなるもの；および配列番号32に示される3アミノ酸残基（Trp-Arg-Pro）からなるものなどを例示できる。
- より詳しくは、例えば配列番号12に示すものは、配列番号11において4～11番目のアミノ酸配列部分の  
20 みを残存させたものである。配列番号13に示すものは、配列番号5に示す15アミノ酸配列の内、N末端より8アミノ酸配列を残存させ、残りの7つのアミノ酸残基を



欠失させたものである。配列番号 14 に示すものは、配列番号 6 に示すアミノ酸配列の N 末端より 7 つのアミノ酸残基を欠失させた 8 アミノ酸配列からなるものである。配列番号 15 に示すものは、配列番号 5 に示すアミノ酸配列の 2 ～ 6 アミノ酸配列からなるものである。配列番号 16 に示すものは、配列番号 6 の 9 ～ 13 アミノ酸配列からなるものである。また、配列番号 17 に示すものは、配列番号 1 に示すアミノ酸配列の 1 ～ 4 アミノ酸配列の N 末端に Ala を付加したものである。

- 10      また、本発明ペプチド中、少なくとも 2 つのシステイン残基を有するペプチド、例えば配列番号 11 で示されるアミノ酸配列のペプチドは、自発的に環状化すると考えられ、このような環状ペプチドは、線状形態で存在する場合においても活性を有する場合があるので、該ペプチド内のひとつまたは両方のシステイン残基は、本発明のペプチドの帰巢特性に著しい影響を与えることなく、欠失させることができる。かかる現象は、例えばコイビ
- 15      ーネンらの報告 (Koivunen, et al., J. Biol. Chem., 268, 20205-20210 (1993)) に支持される。上記欠失されたア
- 20      ミノ酸配列を有するペプチドの具体例は、配列番号 12 に示すとおりである。このような一部欠失されたアミノ酸配列を有するペプチドも、これが上記新生血管帰巢特

性を有する限り本発明に包含される。

以下、本明細書において、「新生血管特異的ペプチド」乃至「本発明ペプチド」なる語には、上述した配列番号 1 ～ 11 のアミノ酸配列を基準として、その一部アミノ酸配列が欠失した部分ペプチドなどの改変されたアミノ酸配列を有するペプチドも含めるものとする。

本発明に係る新生血管特異的ペプチドには、また、上記配列番号 1 から 11 で示されるアミノ酸配列を有するペプチドや該アミノ酸配列を改変され且つ新生血管に帰巢する性質を有するペプチドと共に、これらペプチドのデンドリマーが包含される。

ここで、デンドリマーなる語は、一定の組成と分子量を有する球形乃至他の三次元構造の巨大分子として知られており、また多抗原性ペプチド (multiple antigen peptide: MAP) としても知られている。その合成は、例えば複数個の機能基を有する化学構造核から出発して、各機能基に化学構造核が有すると同一の機能基を複数個その末端に有する枝 (繰返し単位) を結合させ、更に末端の機能基に順次同一の繰返し単位を導入することにより実施できる。その詳細は特表昭 60-500295 号公報、特開昭 63-99233 号公報、特開平 3-263431 号公報、米国特許第 4507466 号明細

書、同第4568737号明細書、ポリマージャーナル (Polymer Journal) 第17巻第117頁(1985)、アングバンテヘルミー (Tomalia, et al., Angewandte Chem. Int. Engl.) 第29巻第138-175頁(1990)、  
5 マクロモレキュールズ (Macromolecules) 第25巻第3247頁(1992)等に記載されている。

上記のようにデンドリマーは、その樹枝状形状から星形の立体配置を有する球状の外観を呈する開始部分となる核構造、開始核に放射状に結合した繰り返し単位で構成される内部層(世代)および各分枝の最も外側の末端に結合した活性化官能基よりなる外表面を有している。デ  
10 ンドリマーの大きさ、形態および反応性は、開始核部分、デンドリマーを製造する際に決定される世代の数および各世代に用いられる繰り返し単位を選択することによって調節することが可能である。  
15

異なる大きさのデンドリマーは、利用される世代の数を増やすことによって容易に得ることが可能であり、その製造は、例えば米国特許第4694064号明細書の記載を参考にすることができる。ここで、窒素原子を開  
20 始部分となる核構造部分とし、核構造部分に結合する  $-\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CONHCH}_2\text{CH}_2-$  構造からなる繰り返し単位、そして各分枝の最も外側の末端のアミノ基に結合した活性化官

能基として、例えば配列番号 1 ～ 17 からなる本発明血管新生特異的ペプチドを構成成分とするデンドリマー、あるいは後記実施例に示される、リジン、アルギニン、グルタミン酸、アスパラギン酸等のアミノ酸を核構造部分とし、核構造部分に直説結合する繰返し単位を同様に前記アミノ酸とし、活性化官能基として配列番号 1 ～ 17 から選ばれるアミノ酸配列の本発明血管新生特異的ペプチドまたは配列番号 19、21、23 ～ 25 および 28 ～ 32 から選ばれるアミノ酸配列の本発明血管新生特異的ペプチドを有するデンドリマーを例示することができる。

前記窒素原子を開始部分とするデンドリマーは、例えば米国ポリサイエンス社 (Polysciences, Inc., 400 Vally Road, Warrington, PA, 18976, U. S. A.) から市販されているものを用い、後記の固相合成法を用いて本発明血管新生特異的ペプチドを各分枝の最も外側の末端に結合したデンドリマーを製造することができる。同様にリジンを開始部分となる核構造部分とし、核構造部分に直説結合するアミノ酸を同じくリジンからなる繰返し単位、そして後記の固相合成法を用いて本発明血管新生特異的ペプチドを各分枝の最も外側の末端に結合したデンドリマーを製造することができる。このデンドリマーには渡辺

化学工業社製の  $\text{Fmoc}_8\text{-Lys}_4\text{-Lys}_2\text{-Lys-}\beta\text{Ala-Alko}$  樹脂を用いることができる。また、上記において、各分枝の最も外側の末端に結合する本発明血管新生特異的ペプチドの一部に変えて、もしくは核構造部分に結合させる形で、抗癌活性を有する構成成分を結合させたデンドリマーを製造することもできる。

上記各デンドリマーは、例えば以下の如くして合成することができる。即ち、固相ペプチド合成用の樹脂に、スパーサーを介してまたは介さずに2つのアミノ基を同一のまたは同一でない保護基で保護した  $\alpha, \omega$ -ジアミノ酸を繰り返し単位として、その繰り返し単位の縮合と保護基の除去を繰り返すことによりデンドリマーを得ることができる。

ここで、固相ペプチド合成用の樹脂としては、ポリスチレン樹脂、ポリアクリルアミド樹脂、ポリスチレンポリエチレングリコール樹脂などの末端にクロロメチル基、4-(ヒドロキシメチル)フェノキシ基、4-( $\alpha$ -2', 4'-ジメトキシフェニル)-9-フルオレニルメトキシカルボニルアミノメチル)フェノキシ基などを有する通常のペプチド合成に用いられる樹脂を使用することができる。

スパーサーとしては1個または複数個のアミノ酸を挙

げることができる。  $\alpha$  ,  $\omega$  -ジアミノ酸としてはリジン、  
オルニチン、 1, 4 -ジアミノ酪酸、 1, 3 -ジアミノ  
プロピオン酸などが挙げられる。保護基としてはBoc基、  
Fmoc基、 Z基などが挙げられる。したがって機能基として  
5 はアミノ基、カルボキシル基、水酸基などが挙げられる。  
枝数としては、繰り返し単位の縮合と保護基の除去を n  
回繰り返すことにより  $2n$  となる。具体的には  $2 \sim 16$   
の数が挙げられる。

かかるデンドリマーの精製は通常の技術、例えばセフ  
10 アクリール S - 300 (ファルマシア社製) などのマト  
リックスでのサイズ排除可能な樹脂を用いたクロマトグ  
ラフィー操作などにより実施できる。

かくして得られるデンドリマーペプチドは、その枝部  
分に存在する本発明血管新生特異的ペプチドが、その本  
15 来の血管新生に選択的に帰巢し、血管新生抑制作用を奏  
し、かくして所望の制癌効果および癌転移抑制効果を奏  
し得るのである。しかも該デンドリマーペプチドは、そ  
の内部に制癌作用を有する公知の薬剤を包み込んで投与  
すれば、標的とする血管新生部分にだけ該薬剤を作用さ  
20 せることができ、より副作用の少ない薬剤とすることが  
できる利点がある。

上記デンドリマーペプチドにおいて、その枝部分に存

- 在させる本発明血管新生特異的ペプチドは、各枝共、同一のペプチドである必要はなく、異なるアミノ酸配列のペプチドを複数個組み合わせたものであってもよい。その例としては、例えば配列番号 1、配列番号 5、配列番号 6 のアミノ酸配列のペプチドを、或いは配列番号 1 ~ 1 1 に示される 1 5 アミノ酸配列のペプチド、配列番号 1 2 ~ 1 4 および 2 1 に示される 8 アミノ酸配列のペプチド、配列番号 1 5 ~ 1 7 および 2 3 ~ 2 5 に示される 5 アミノ酸配列のペプチド、配列番号 2 8 ~ 3 1 に示される 4 アミノ酸配列、および配列番号 3 2 に示される 3 アミノ酸配列のそれぞれを、別の枝部分に結合させたものを例示できる。このようなデンドリマーは、投与対象における血中および組織中での安定性、結合された分子の比活性等を向上させることができる。
- 15 本発明新生血管特異的ペプチドは、そのアミノ酸配列に従って、一般的な化学合成法により製造することができる。該方法には、通常、液相法および固相法によるペプチド合成法が包含される。かかるペプチド合成法は、より詳しくは、アミノ酸配列情報に基づいて、各アミノ酸を 1 個ずつ逐次結合させ鎖を延長させていくステップワイズエロンゲーション法と、アミノ酸数個からなるフラグメントを予め合成し、次いで各フラグメントをカッ
- 20

プリング反応させるフラグメント・コンデンセーション法とを包含する。本発明新生血管特異的ペプチドの合成は、そのいずれによることもできる。

上記ペプチド合成に採用される縮合法も、公知の各種方法に従うことができる。その具体例としては、例えばアジド法、混合酸無水物法、DCC法、活性エステル法、酸化還元法、DPPA(ジフェニルホスホリルアジド)法、DCC+添加物(1-ヒドロキシベンゾトリアゾール、N-ヒドロキシサクシンアミド、N-ヒドロキシ-5-ノルボルネン-2,3-ジカルボキシイミド等)、ウッドワード法等を例示できる。これら各方法に利用できる溶媒もこの種ペプチド縮合反応に使用されることがよく知られている一般的なものから適宜選択することができる。その例としては、例えばN-メチルピロリドン(NMP)、ジメチルホルムアミド(DMF)、ジメチルスルホキシド(DMSO)、ヘキサホスホロアミド、ジオキサン、テトラヒドロフラン(THF)、酢酸エチル等およびこれらの混合溶媒等を挙げることができる。

尚、上記ペプチド合成反応に際して、反応に関与しないアミノ酸及至ペプチドにおけるカルボキシル基は、一般にはエステル化により、例えばメチルエステル、エチルエステル、第三級ブチルエステル等の低級アルキルエ



ステル、例えばベンジルエステル、p-メトキシベンジルエステル、p-ニトロベンジルエステルアラルキルエステル等として保護することができる。また、側鎖に官能基を有するアミノ酸、例えばTyrの水酸基は、アセチル

5 基、ベンジル基、ベンジロキシカルボニル基、第三級ブチル基等で保護されてもよいが、必ずしもかかる保護を行う必要はない。更に例えばArgのグアニジノ基は、ニトロ基、トシル基、2-メトキシベンゼンスルホニル基、メチレン-2-スルホニル基、ベンジロキシカルボニル

10 ル基、イソボルニルオキシカルボニル基、アダマンチルオキシカルボニル基等の適当な保護基により保護することができる。上記保護基を有するアミノ酸、ペプチドおよび最終的に得られる本発明新生血管特異的ペプチドにおけるこれら保護基の脱保護反応もまた、慣用される方

15 法、例えば接触還元法や、液体アンモニア/ナトリウム、フッ化水素、臭化水素、塩化水素、トリフルオロ酢酸、酢酸、蟻酸、メタンスルホン酸等を用いる方法等に従って、実施することができる。

かくして得られる本発明の新生血管特異的ポリペプチ

20 ドは、通常の方法に従って、例えばイオン交換樹脂、分配クロマトグラフィー、ゲルクロマトグラフィー、アフィニティークロマトグラフィー、高速液体クロマトグラ

フィー (HPLC)、向流分配法等のペプチド化学の分野で汎用されている方法に従って、適宜その精製を行うことができる。

上記により得られる本発明新生血管特異的ペプチド

- 5 (そのデンドリマーを含む、以下同じ) は、新生血管に特異的に帰巢する作用を有しており、それら自身で新生血管形成抑制剤として有用である。また、本発明新生血管特異的ペプチドは、癌組織の新生血管に特異的に帰巢する作用を有するため、癌組織に対するリガンドとして、  
10 例えば癌化学療法剤のような抗癌剤などの薬物と結合させて用いることができる。

ここで、対象とする各種癌疾患としては、例えば、黒色腫、大腸癌、卵巣癌、肝癌、乳癌、脳腫瘍、腎癌、膵臓癌、子宮頸癌、食道癌、肺癌、胃癌などを例示できる。

- 15 また、本発明新生血管特異的ペプチドと結合させて用いることのできる薬物としての抗癌剤または抗癌活性成分としては、5-フルオロウラシル (5-FU) を代表として、以下の各種の癌化学療法剤を例示することができる。即ち、アルキル化剤、例えばシクロホスファミド、  
20 メルファラン、ラニムスチン、イホスファミド、塩酸ナイトロジェンマスタード-N-オキシドなど；代謝拮抗剤、例えば6-メルカプトプリン、リボシド、エノシタ

ビン、カルモフル、シタラビン、シタラビンオクホスフェート、テガフル、5-FU、ドキシフルウリジン、ドキシフルリジン、ヒドロキシカルバミド、フルオロウラシル、メトトレキサート、メルカプトプリンなど；

5 抗腫瘍性抗生物質製剤、例えばアクチノマイシンD、塩酸アクラルピシン、塩酸イダルピシン、塩酸エピルピシン、塩酸ドキソルピシン、塩酸ダウノルピシン、塩酸ピラルピシン、塩酸ブレオマイシン、ジノスタチンスチマラマー、硫酸ブレオマイシン、マイトマイシンC、ネオ

10 カルチノスタチン、硫酸ペプロマイシンなど；抗腫瘍性植物成分製剤、例えばエトポシド、塩酸イリノテカン、ドセタキセル水和物、硫酸ピンクリスチン、硫酸ビンデシン、硫酸ピンブラスチン、パクリタキセル、その他、アセグラトン、ウベニメクス、シスプラチン、シゾフィ

15 ラン、ソブゾキサシ、クレスチン、クエン酸トレミフェン、酢酸メドロキシプロゲステロン、クエン酸タモキシフェン、カルボプラチン、塩酸ファドロゾール水和物、塩酸プロカルバジン、塩酸ミトキサントロン、L-アスパラギナーゼ、トレチノイン、ネダプラチン、ピシバニ

20 ール、フルタミド、ペントスタチン、ポルフィマーナトリウム、レンチンナンなど。

また、抗腫瘍活性を有するサイトカインとしては、I

F N -  $\alpha$ 、 I F N -  $\beta$ 、 I F N -  $\gamma$ 、 I L - 1、 I L - 2、 I L - 1 2、 T N F、 T G F -  $\beta$ 、 アンジオスタチン、 トロンボスポンジン、 エンドスタチンなどが例示される。抗体または抗体断片としては、抗 V E G F 抗体、  
5 抗 F G F 抗体、抗 H G F 抗体 I 抗 L - 8 抗体などの癌の増殖・促進に関連する因子に対する抗体またはそれらの抗体断片を例示できる。

このように、本発明の新生血管特異的ペプチドは、これに制癌剤や抗癌活性を有するサイトカインなどの活性  
10 薬物を結合させるかまたは修飾させてリボソーム製剤にするなどの、D D S 製剤を作成することができ、かかる製剤は癌に対するアクティブターゲティングを行うことができる。

本発明新生血管特異的ペプチドを抗癌活性を有するサイトカイン等の蛋白質と結合させる場合、かかる結合物は、遺伝子組換え技術に従い、本発明ペプチドと上記サイトカイン等との融合蛋白質として発現させることができる。かかる融合蛋白質の製造および発現は、この分野で周知慣用の技術に従うことができる。即ち、融合蛋白質は、通常の遺伝子組換え技術(例えば、*Science*, 224,  
15 1431 (1984); *Biochem. Biophys. Res. Comm.*, 130, 692 (1985); *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.*, 80, 5990 (1983)な

ど参照)に従って調製できる。また融合蛋白質の製造および発現に際しては、大野らの方法「タンパク実験プロトコール1機能解析編、細胞工学別冊、実験プロトコールシリーズ、1997年、秀潤社」を参考にすることができる。

- 5 得られた組換え融合蛋白質は、所望により、その物理的性質、化学的性質等を利用した各種の分離操作〔「生化学データブックII」、1175-1259頁、第1版第1刷、1980年6月23日株式会社東京化学同人発行；

Biochemistry, 25(25), 8274-8277 (1986); Eur. J.

- 10 Biochem., 163, 313-321 (1987) 等参照〕により分離、精製できる。該方法としては、具体的には例えば通常の再構成処理、蛋白沈澱剤による処理（塩析法）、遠心分離、浸透圧ショック法、超音波破碎、限外濾過、分子篩クロマトグラフィー（ゲル濾過）、吸着クロマトグラフ  
15 ィー、イオン交換クロマトグラフィー、アフィニティクロマトグラフィー、高速液体クロマトグラフィー

（HPLC）等の各種液体クロマトグラフィー、透析法、これらの組合せ等を例示できる。特に好ましい上記方法としては、所望の蛋白質を結合させたカラムを利用した

- 20 アフィニティクロマトグラフィーを例示できる。

また、本発明新生血管特異的ペプチドを、物理的、化学的または生物学的な物質と結合させてリガンドとして

利用する場合、該物理的、化学的または生物学的な物質は、前記癌化学療法剤（抗癌剤等）を含有し得る室のあるマイクロデバイスのような薬物送達系物質であることもできる。かかる薬物送達系物質の例としては、例えば  
5 リポソーム、透過性若しくは半透過性の膜を含有するマイクロカプセル、他の室を有するマイクロデバイスなどの生物学的物質を挙げることができる。これらは、一般に非毒性で、好ましくは生分解性であるのがよい。

上記抗癌剤等の薬物を含有し得る種々の薬物送達系物質を本発明ペプチドと結合させる方法は、この分野において周知であり、具体的には、例えばハロウらやヘルマンソン(Harlow and Lane, Antibodies: A laboratory  
10 manual (Cold Spring Harbor Laboratory Press (1988): Hermanson, Bioconjugate Techniques, Academic Press  
15 (1996))の方法を挙げることができる。

以下、上記薬物送達系物質と本発明ペプチドとの結合による製剤の具体例としてのリポソーム製剤につき詳述する。

リポソーム製剤は、酸性リン脂質を膜構成成分とする  
20 か或いは中性リン脂質と酸性リン脂質とを膜構成成分とするリポソームに、本発明ペプチドを保持させることにより得られる。

- ここで、膜構成成分としての酸性リン脂質としては、通常の酸性リン脂質より狭義に定義され、より具体的にはジラウロイルホスファチジルグリセロール (DLPG)、ジミリストイルホスファチジルグリセロール (DMPG)、
- 5 ジパルミトイルホスファチジルグリセロール (DPPG)、ジステアロイルホスファチジルグリセロール (DSPG)、ジオレオイルホスファチジルグリセロール (DOPG)、卵黄ホスファチジルグリセロール (卵黄PG)、水添卵黄ホスファチジルグリセロール等の天然または合成ホス
- 10 ファチジルグリセロール類 (PG) およびジラウロイルホスファチジルイノシトール (DLPI)、ジミリストイルホスファチジルイノシトール (DMPI)、ジパルミトイルホスファチジルイノシトール (DPIPI)、ジステアロイルホスファチジルイノシトール (DSPI)、
- 15 ジオレオイルホスファチジルイノシトール (DOPPI)、大豆ホスファチジルイノシトール (大豆PI)、水添大豆ホスファチジルイノシトール等の天然または合成ホスファチジルイノシトール類 (PI) を示す。これらは一種単独でまたは二種以上混合して使用できる。
- 20 また、中性リン脂質としては、大豆ホスファチジルコリン、卵黄ホスファチジルコリン、水添大豆ホスファチジルコリン、水添卵黄ホスファチジルコリン、ジミリス

トイルホスファチジルコリン (D M P C)、ジパルミト  
イルホスファチジルコリン (D P P C)、ジラウロイル  
ホスファチジルコリン (D L P C)、ジステアロイルホ  
スファチジルコリン (D S P C)、ミリストイルパルミ  
5 トイルホスファチジルコリン (M P P C)、パルミトイ  
ルスステアリイルホスファチジルコリン (P S P C)、ジ  
オレオイルホスファチジルコリン (D O P C) 等の天然  
または合成ホスファチジルコリン類 (P C)、大豆ホス  
ファチジルエタノールアミン、卵黄ホスファチジルエタ  
10 ノールアミン、水添大豆ホスファチジルエタノールアミ  
ン、水添卵黄ホスファチジルエタノールアミン、ジミリ  
ストイルホスファチジルエタノールアミン (D M P E)、  
ジパルミトイルホスファチジルエタノールアミン  
(D P P E)、ジラウロイルホスファチジルエタノール  
15 アミン (D L P E)、ジステアロイルホスファチジルエ  
タノールアミン (D S P E)、ミリストイルパルミトイ  
ルホスファチジルエタノールアミン (M P P E)、パル  
ミトイルステアロイルホスファチジルエタノールアミン  
(P S P E)、ジオレオイルホスファチジルエタノール  
20 アミン (D O P E) 等の天然または合成ホスファチジル  
エタノールアミン類 (P E) 等を例示できる。これらは  
一種単独でまたは二種以上混合して使用することができ



る。

上記リポソーム膜は、上記酸性リン脂質を単独で構成成分として用いるかまたは上記中性リン脂質と酸性リン脂質とを併用して常法に従い形成される。ここで酸性リン脂質の併用割合は、リポソーム膜構成成分中に約  
5 0. 1 ~ 1 0 0 モル % 程度、好ましくは約 1 ~ 9 0 モル %、より好ましくは約 1 0 ~ 5 0 モル % 程度とするのがよい。

上記リポソームの調製に当たっては、更に例えばコレステロールなどを添加することができる。このコレステロールの添加によればリン脂質の流動性を調製して、リポソームの調製をより簡便なものとすることができる。該コレステロールは通常リン脂質に対して等量まで、好ましくは 0. 5 ~ 1 倍等量の量で添加配合されるのが好  
10 ましい。  
15 ましい。

リポソーム分散液中の有効成分と酸性リン脂質との配合割合は、有効成分に対して酸性リン脂質が約 0. 5 ~ 1 0 0 当量程度、好ましくは約 1 ~ 6 0 当量程度、より好ましくは約 1. 5 ~ 2 0 当量程度とされるのがよい。

20 また、本発明のペプチド修飾に用いられるペプチドの全脂質中のモル % は、数モル % から数十モル % 程度、好ましくは 5 ~ 1 0 モル % 程度までのモル %、通常は 5 モ

- ル%程度でもあってもよい。後記実施例4に示されるように本発明ペプチドそれ自体に抗癌活性がある場合は、5～40モル%程度であってもよい。尚、水溶性の抗癌剤または抗癌活性を有する物質の場合は、リポソーム内
- 5 水層に封入するので、10%から90%の効率で封入されることとなる、対照的に脂溶性の抗癌剤または抗癌活性を有する物質の場合は、リポソーム膜内に所望の有効成分を封入する場合は、100%近くの高い封入効率で行うことが可能である。
- 10 次に、上記リポソームの製造法を説明する。該リポソームを製造するに当っては、種々の公知の方法を用いることができる。例えばリポソーム膜構成成分をクロロホルム等の有機溶媒に溶解後、溶媒を減圧留去してリピッドフィルムを形成させ、これに薬物を溶解した水相を添
- 15 加し脂質の相転移温度以上に加温し、ボルテックス、ホモジナイズ等の処理によりリポソーム分散液を調製する。また、粉末状リポソーム膜構成成分を相転移温度以上に加温し、薬物水溶液と混合攪拌することにより、リポソーム分散液を調製することもできる。尚、添加する薬物
- 20 水溶液は薬物が溶けている限り任意のものを使用でき、添加する薬物水溶液の量も任意に増減できる。

このようにして得られたリポソームの分散液は必要に

応じて限外濾過膜法、例えばポリカーボネート製メンブ  
ランフィルターを用いて粒径分布をコントロールするこ  
とも可能である。透析膜を用いて濃縮することも可能で  
ある。

- 5      また、このリポソーム分散液には、製剤設計上必要な  
添加剤として、防腐剤、等張化剤、緩衝剤、安定化剤、  
可溶化剤、吸収促進剤等の各種の公知物質を適宜配合す  
ることができ、また必要に応じてこれらの添加物を含む  
液または水で希釈することもできる。上記添加剤の具体  
10   例としては、防腐剤としては塩化ベンザルコニウム、塩  
化ベンゼトニウム、クロロヘキシジン、パラベン類（メ  
チルパラベン、エチルパラベン等）、チメロサル等の  
真菌および細菌に有効な防腐剤を、等張化剤としてはD  
ーマンニトール、Dーソルビトール、Dーキシリトール、  
15   グリセリン、ブドウ糖、マネトース、蔗糖、プロピレン  
グリコール等の多価アルコール類や塩化ナトリウム等の  
電解質類を、また安定化剤としてはトコフェロール、ブ  
チルヒドロキシアニソール、ブチルヒドロキシトルエン、  
エチレンジアミン四酢酸塩（EDTA）、システイン等  
20   をそれぞれ例示できる。

上記リポソーム分散液の具体例は、例えば後記実施例  
5、7および8に示されている。

更に、本発明新生血管特異的ペプチドは、その有する癌の新生血管特異的に帰巢する作用を利用して、これらに放射性化合物、蛍光物質、酵素、ビオチン、造影剤などを結合させて、癌に対するアクティブターゲティングを実施することにより、癌の診断剤等として利用することができる。

また、本発明新生血管特異的ペプチドは、これらに脂肪酸(ベヘン酸、ステアリン酸、パルミチン酸、ミリスチン酸、オレイン酸等)、アルキル基、コレステリル基等を結合させて、これらを含むリポソーム、脂質乳剤とし、これらと共に制癌剤や抗癌活性を有するサイトカインなどを含む医薬組成物として癌に対するアクティブターゲティングを行うこともできる。上記リポソーム製剤の製造についての詳細は、例えばウッドレら(Long  
15 Circulating Liposomes: old drugs, New therapeutics., M. C. Woodle, G. Storm, Eds: Springer-Verlag Berlin (1998))の文献に記載されている。また、上記脂質乳剤と共に制癌剤や抗癌活性を有するサイトカインなどを含む医薬組成物の製造についての詳細は、ナンバらの文献  
20 (Liposomal applications to cancer therapy, Y. Namba, N. Oku, J. Bioact. Compat. Polymers, 8, 158-177(1993))に記載されている。

更に、本発明新生血管特異的ペプチドは、これらに各種脂肪酸、アルキル基、コレステリル基等を結合させて、これらを含むリポソーム、脂質乳剤とし、これらに癌造影のために放射性化合物、造影剤などを更に結合させて、

5 癌に対するアクティブターゲティングを行うことによって、癌の診断剤としても利用することができる。これらは即ち癌の存在を同定する癌診断剤となり得る。かかる診断剤の利用によれば、特に他の方法では検出されないかもしれない、初期性腫瘍並びに転移性病巣を同定できる

10 利点がある。従って、本発明は癌の診断方法、特に初期性癌並びに転移性病巣を同定する診断方法をも提供するものである。

かくして癌の存在が同定されることにより、本発明の別の実施態様において、新生血管特異的ペプチドは、癌

15 に対して薬剤を帰巢させるために抗癌剤、例えば癌化学療法剤と結合され得るか、または例えば癌化学療法剤または他の抗癌性因子を含有するマイクロデバイスと結合され得、かくして癌または癌細胞の選択的殺傷を可能なものとする一方、正常組織または正常細胞には影響を少

20 なくするという所望のアクティブターゲティングを実施可能とする。この点で、本発明は癌および癌転移の治療および転移抑制方法をも提供するものである。

本発明の新生血管抑制剤乃至癌治療組成物は、有効成分としての新生血管特異的ペプチドまたはこれと他の抗癌剤などとの複合体と共に、薬学的に許容される担体を含有する製剤組成物として患者に投与される。

- 5      ここで、用いられる薬学的に許容される担体は、当該分野において周知されており、調製される製剤組成物の形態に応じて適宜選択できる。例えば、組成物が水溶液形態に調製される場合、上記担体としては水または生理学的緩衝液を利用できる。また、組成物が適当な溶液形  
10 態に調製される場合、上記担体としては、例えば、グリコール、グリセロール、オリーブ油のような注入可能な有機エステルなどを使用できる。

- 更に有効成分として上記複合体を利用する場合、上記担体としては、例えば複合体の吸収を安定化または増加  
15 させるように作用する化合物を使用することもできる。  
かかる化合物としては、例えば、グルコース、スクロースまたはデキストランのような炭水化物、アスコルビン酸またはグルタチオンのような抗酸化剤、キレート剤、  
低分子タンパク質或いはアルブミンのような安定化剤乃  
20 至賦形剤を例示することができる。

本発明の新生血管抑制剤または癌治療組成物（製剤）中に含まれる有効成分の量は、広範囲から選択すること

ができ特に制限されるものではない。通常、本発明新生血管特異的ペプチドを単独で有効成分とする場合には、これは製剤中に約 0. 0 0 0 0 1 ~ 7 0 重量%、好ましくは約 0. 0 0 0 1 ~ 5 重量%含有される量の範囲から

5 選択されるのが望ましい。また、上記製剤の投与量も、特に限定されず、所望の治療効果、投与方法（投与経路）、治療期間、患者の年齢、性別その他の条件などに応じて広範囲から適宜選択することができる。一般に、該投与量は、患者 1 日当たり体重 1 k g 当たり、約 0. 0 1

10  $\mu$  g ~ 1 0 m g 程度、好ましくは約 0. 1  $\mu$  g ~ 1 m g 程度の範囲から選ばれるのがよい。該製剤は 1 日当たり 1 回投与に限らず、数回に分けて投与することができる。

また、本発明新生血管特異的ペプチドを制癌剤および癌転移抑制剤と共に用いて調製される本発明の新生血管

15 抑制剤または癌治療組成物の投与量は、本発明新生血管特異的ペプチドと結合させて用いられる、例えば所望の制癌効果を有するための癌化学療法剤（薬物）の量に依存して適宜決定することができる。例えばこの種の臨床利用に際して、制癌剤有効成分として一般に使用される

20 5 - フルオロウラシル（5 - F U）を用いる場合、該 5 - F U は通常 1 日当たり約 0. 1 m g / k g ~ 5 0 m g / k g 程度投与される。これと結合させて利用される本

発明新生血管特異的ペプチドの量は、自ずと明らかであり、かかる量が本発明ペプチドの有効量とされ得ることは当業者であれば容易に理解できる。しかも、本発明の医薬組成物は、癌の新生血管に特異的に帰巢する作用を有する特徴があることを考慮すれば、癌化学療法剤の投与量は、従来使用の臨床用量よりもかなり少なくても、有効に奏効するであろうことが予測される。

上記したように、本発明新生血管特異的ポリペプチドは、これらに癌造影のために、放射性化合物、造影剤などを結合させて診断剤として、癌に対するアクティブターゲットティングを実施することができる。また本発明新生血管特異的ポリペプチドは、人体から単離された細胞、組織、器官、それらの一部分における新生血管形成の存在を検出するために、使用することができる。かかる使用によれば、上記新生血管が癌により形成されたものであるため、結果として、人体から単離された試料中の癌の存在を検出することができる。上記ヒト試料は、例えば生検によって得られる組織切片乃至標本、組織培養中に存在するかまたは適応された細胞であることができる。また、上記ヒト試料は、ホモジナイゼーションによって処理されたものであってもよく、これが好ましい。

#### 図面の簡単な説明



図 1 は、実施例 3 (3) に従う各ファージと 8 残基合成ペプチドの競合阻害実験結果を示す棒グラフである。

図 2 は、実施例 3 (3) に従う各ファージと 5 残基合成ペプチドの競合阻害実験結果を示す棒グラフである。

5 図 3 は、実施例 4 (2) に示すデンドリマーペプチドの血管新生抑制効果を示すグラフである。

図 4 は、実施例 5 (2) に示す担癌マウスのリポソーム溶液の体内分布を示すグラフである。

図 5 は、実施例 6 の (1) に示すデンドリマーペプチドの腫瘍増殖抑制効果を示すグラフである。  
10

図 6 は、実施例 6 の (2) に示す本発明ペプチドの腫瘍増殖抑制効果を示すグラフである。

図 7 は、実施例 6 の (3) に示す本発明ペプチドの腫瘍増殖抑制効果を示すグラフである。

15 図 8 は、実施例 6 の (4) に示す本発明ペプチドの腫瘍増殖抑制効果を示すグラフである。

図 9 は、実施例 6 の (5) に示す本発明ペプチドの腫瘍増殖抑制効果を示すグラフである。

図 10 および図 11 は、実施例 6 の (6) に示す本発明ペプチドの腫瘍増殖抑制効果を示すグラフである。  
20

図 12 は、実施例 7 の (1) に示す本発明ペプチド修飾リポソームの腫瘍増殖抑制効果を示すグラフである。

図 1 3 は、実施例 7 の (2) に示す本発明ペプチド修飾リボソームの腫瘍組織に対する親和性を示すグラフである。

図 1 4 は、実施例 7 の (3) に示す本発明ペプチド修飾リボソームの血中安定性を示すグラフである。

- 5 図 1 5 は、実施例 8 に従う本発明新生血管特異的ペプチドと抗癌剤とを有効成分として含有するリボソームの抗腫瘍効果を示すグラフである。

#### 発明を実施するための最良の形態

- 以下、本発明を更に詳しく説明するため、実施例を挙  
10 げるが本発明はこれに限定されるものではない。

#### 実施例 1 新生血管特異的ペプチドの同定

##### (1) ファージディスプレイライブラリーの調製

- ニシ、サヤらの報告 (Nishi T., Saya H., et al.,  
FEBS Lett, 399, 237-240 (1996)) に従って、ファージ  
15 のコートタンパク質 p III 遺伝子に 15 残基のランダムな  
アミノ酸配列ペプチドをコードするランダム DNA を挿  
入して、ファージ外殻表面にランダムな 15 残基のアミ  
ノ酸配列ペプチドを発現できる、所望のファージディス  
プレイライブラリーを構築した。

- 20 上記で構築されたファージディスプレイライブラリー  
の特徴は、スコットら (Scott, J. K. and Smith, G. P.,  
Science, 249, 386-390 (1990)) により報告されている。

## (2) 新生血管の形成

新生血管特異的ペプチド発現ファージの標的となる腫瘍新生血管を、インビボで誘導するためにチャンパーリング法(Folkman, J., et al., J. Exp. Med., 133, 275-288 (1971))を採用した。

ここでチャンパーリング法は、インビボで腫瘍新生血管の誘導を起こすために確立された手法の一つであり、リングの中に癌細胞を封入し、動物皮下に移植することで皮膚に新生血管の誘導を起こさせるものである。リングのフィルターは細胞を透過させず、液性因子のみを透過させる性質があるため、この手法によれば、動物の組織に癌が転移することなく、また、免疫細胞による癌細胞への傷害もなく、新生血管形成を誘導することができる。

この手法につき詳述すれば、まずリング(外径14 mm、内径10 mm、高さ2 mm、養鯉用0.2 mlのミリポアリングPR0001401、ミリポア社製)の中に、B16BL6メラノーマ細胞(Dr. G. L. Nicolson(Institute for Molecular Medicine Irvine, CA)より入手、Cancer Res., 57, 3612-3619(1997); FEBS Lett., 427, 286-290(1998)等参照)の細胞浮遊液( $1 \times 10^7$ 個/0.18 ml)を、チャンパーリング当たり0.18 mlとなる量で注入口よ

り注射器で注入し、ナイロン棒(ミリポア社製)にて注入口を封鎖した。ついで、上記リングを5週令の C 5 7 B L / 6 雄性マウスの背部に移植し、マウスの背部皮膚に新生血管を形成させた。

5 (3) 新生血管特異的ペプチドディスプレイファージの選別(バイオバニング)

チャンバーリング移植5日後にマウスをネンブタール(0.2 ml 腹腔内投与)で麻酔し、上記(1)で得られたランダムペプチドディスプレイファージ( $1 \times 10^{11}$ コロニー形成単位)を0.2 ml 尾静脈内に投与した。投与4分後、マウスを液体窒素中に凍結させた。ドライヤーで凍結させたマウスを融解後、新生血管の形成された皮膚を切り取り、その重量を測定した。

ついで、得られた皮膚をミンチし、タンパク分解酵素阻害剤である1 mM フェニルメチルスルフォニルフルオリド(シグマ社製)を含むダルベッコ修飾イーグル培養溶液(A)(日水製薬(株)製、カタログ番号: Code 05915) 1 ml を加え、氷中でホモジナイズした。ついでエッペンドルフチューブ中に移し、1%ウシ血清アルブミン(インタージーン社製)を含む氷冷の前記(A)培養液(BSA 0.1 g + 100 mM PI, 100  $\mu$ l + DMEM 10 ml)で3回洗浄した。洗浄は遠心器を用い12000回転/分で行った。

遠心後上清を除き、新生血管から回収されたファージを  
大腸菌 K 9 1 K A N (カナマイシン耐性株：熊本大学・腫  
瘍医学講座、佐谷秀幸教授より分与されたものを使用)に  
感染させた。60 分間静置の後、0.2  $\mu$ g/ml テト  
5 ラサイクリン(シグマ社製)を含む N Z Y 培地(10g NZアミ  
ン A：和光純薬社製：Code；541-00241)、5g ビール酵母エ  
キス(商品名：エビオス、アサヒビール社製)および 5g  
NaCl を精製水 1L に溶解し、5N NaOH を 1 ml 加え、pH 7.5 に  
調製し、オートクレーブ滅菌したのち、室温保存したも  
10 のを使用)を 10 ml 加え、37℃で 180～200 回転  
/分で 60 分間インキュベートした。

次いで、線画培養した大腸菌 K 9 1 K A N の 1 コロニ  
ーをかき取り、カナマイシン(和光純薬社製、最終濃度  
100  $\mu$ g/ml)を含む N Z Y 培地 5 ml に懸濁し、37℃で  
15 180～200 回転/分で一晩インキュベートした。さら  
にこの培養液 100  $\mu$ l をカナマイシンを含む N Z Y 培  
地 10 ml に懸濁し、37℃で 180～200 回転/分で  
4 時間インキュベートした。4 時間培養後、培養液を  
10 倍希釈した試料が 600 nm の吸光度で 0.1～  
20 0.2 を示すことを確認し(細胞数が  $5 \times 10^9$  cell/ml)、  
30 分間静置後、ファージを分離・精製し、2 回目以降  
のバイオパニングに用いた。

上記操作を5回繰り返して、新生血管に集積する所望のペプチド発現ファージを得た。上記バイオパニング操作の結果を表1に示す。

表 1

5	バイオパニング	ファージ回収率	ファージ濃縮率
	1 回 目	$2.11 \times 10^{-6}$	1.0 倍
	2 回 目	$2.74 \times 10^{-6}$	1.3 倍
	3 回 目	$6.73 \times 10^{-6}$	3.2 倍
	4 回 目	$5.77 \times 10^{-5}$	27.3 倍
10	5 回 目	$2.09 \times 10^{-3}$	990.5 倍

表1は、1～5回目のバイオパニングによって得られたファージの回収率を示す。表に示されるように尾静脈より投与されたファージ数に対する新生血管部位に集積したファージ数の比を%で示したファージ回収率は、バイオパニングの回数が増加する度に上がっていることが分り、このことから新生血管内皮細胞に特異的に結合するペプチドを発現しているファージが回収されていることが確認された。

#### 20 (4) 新生血管特異的ペプチドの配列決定

上記(3)で得られたファージから、15個のファージについて、発現しているペプチドの配列決定を以下の

とおり行った。

即ち、4回目のバイオパニングの後のタイター測定で得られたプレート上のコロニーをそれぞれ50コロニーずつ、無作為に拾い上げ、新しいN Z Yプレートに、植  
5 菌し直し、一晚37℃にて培養し、これをマスタープレートとして4℃で保存した。

マスタープレートのコロニーを各々20mlのN Z Y培地(20 $\mu$ g/mlテトラサイクリン含有)の入った50ml遠心チューブに懸濁し、37℃で一晩200回転/分で振  
10 盪培養した。

ついで3000回転/分、10分間遠心分離を行った後、上清をオーク・リッジ遠心チューブに移し、12000回転/分で10分間遠心分離し、大腸菌を除菌した。更に上清をオーク・リッジ遠心チューブに移し、3mlのポ  
15 リエチレングリコール(PEG6000:ナカライテスク社製) / NaClを加え、よく攪拌した後、4℃に4時間静置した。12000回転/分で10分間遠心分離し、ファージを沈殿させた。ついで上清を除去し、沈殿したファージを1mlのTBS(トリス緩衝塩溶液)に懸濁させた。

20 1. 5mlのエッペンドルフ・チューブに移し、15000回転/分で10分間遠心分離し、不溶性物質を除去後、上清を別のエッペンドルフ・チューブに移し、

150  $\mu$ l のポリエチレングリコール / NaCl を加え、よく攪拌した後、4℃に1時間静置した。次いで

15000回転/分で10分間遠心分離し、ファージを再沈殿させた。ついで上清を除去し、沈殿したファージを

5 200  $\mu$ l の TBS で再度懸濁した。15000回転/分で10分間遠心分離し、不溶性物質を沈殿させた後、該沈殿物を0.5 ml のエッペンドルフ・チューブに移し、ファージクロンを4℃で保存した。

上記で得られたファージクロンよりのDNAの抽出  
10 は、1.5 ml のエッペンドルフ・チューブにファージクロン100  $\mu$ l に対してTBS100  $\mu$ l およびTE飽和フェノール(ニッポジーン社製)200  $\mu$ l を加えて、10分間激しく攪拌後、15000回転/分で10分間遠心分離した。次いで、上清(水相)200  $\mu$ l に対してTE飽和フェノール200  $\mu$ l およびクロロホルム  
15 200  $\mu$ l を加えて、前記と同様に10分間激しく攪拌後、15000回転/分で10分間遠心分離した。更に、上清(水相)150  $\mu$ l に対してTE250  $\mu$ l、3M酢酸ナトリウム40  $\mu$ l、20 mg/ml グリコーゲン(ペーリンガー・マインハイム社製)1  $\mu$ l およびエタノール  
20 1 ml を加えて、1.5 ml のエッペンドルフ・チューブにて-20℃で、一時間放置した後、15000回転



/分で10分間遠心分離した。上清を取り除き、1 ml の  
80%エタノール(-20℃)を緩やかに加えて、  
15000回転/分で10分間遠心分離し残存する塩を除  
いた。上清を除去後、チューブ内の水分を蒸発させ、沈  
殿しているDNAを10  $\mu$  l の滅菌蒸留水に溶解し、4  
5℃にて保存した。かくして得られた個々のファージ  
DNAをペプチドの配列決定のために使用した。

ファージDNAによりコードされるペプチドの配列決  
定は、ジデオキシ法 (Proc. Natl. Acad. Sci., USA., 74,  
10 5463-5467(1977)) により、アマシャム社のTHERMO配列  
キット (Amersham Life Science, Code: US79765, Lot番  
号: 201503) を用いて機器の使用説明書に従い実施した。  
DNAの伸長反応は、96℃、30秒、45℃、15秒、  
60℃、4分を1サイクルとして、30サイクル行い、  
15 DNAの配列は、ABI社製のDNAシーケンサー (ABI  
PRISM TM377 DNAシーケンサー) を用いて行った。

かくして決定された新生血管特異的ペプチドのアミノ  
酸配列を表2に、1文字アミノ酸表記で示す。

表 2

ファージ番号	ペプチド配列
No. 1	P R P G A P L A G S W P G T S (5 個)
No. 2	A X E W L D A L F V R H V D R
5 No. 3	A A E W L D A F F V R H V D R
No. 4	A P C C S H L D A S P F Q R P
No. 5	D R W R P A L P V V L F P L H
No. 6	A S S S Y P L I H W R P W A R
No. 7	R A S D V G S D V V P R Y P F
10 No. 8	X F A R A P V E H H D V V G L
No. 9	G D V W L F L T S T S H F A R
No. 10	P A Q S N F V T W G Y N V A V
No. 11	E G C S V S S V G A L C T H V

15 上記表 2 に示されるように 15 個のうち、ファージ番号 1 のペプチド配列を発現しているファージは 5 個あった。また、ファージ番号 2 ~ 11 で示されるペプチド配列を発現しているファージはそれぞれ 1 個ずつあった。

(5) 新生血管特異的ペプチド発現ファージの親和性試

#### 20 験 - 1

B 1 6 B L 6 メラノーマ細胞 ( $1 \times 10^6$  個) を 5 週令の C 5 7 B L / 6 雄性マウスの左腹部に移植し、担癌マウ

- スを作製した。癌移植 10 日後（固形癌の直径が約 1 cm 位になったとき）に担癌マウスを上記（3）と同様にネンブータル（0.2 ml 腹腔内投与）で麻酔し、上記（4）で得られ、配列決定された No. 1 ~ No. 11 のペプチド発現ファージおよび尾静脈投与前のファージのそれぞれ（ $1 \times 10^{11}$  コロニー形成単位）を 0.2 ml ずつ尾静脈内に投与した。投与 4 分後、マウスを液体窒素中に凍結させた。ドライヤーで凍結させたマウスを融解後、腫瘍部位を切除し、該重量を測定した。
- 10 得られた腫瘍をミンチし、上記（3）と同様にしてファージを大腸菌に感染させた後、培養した。その後、癌組織内に集積したファージのコロニー形成単位を同様に測定した。
- 15 得られた結果（回収率 %）を、癌組織 100 mg 当たりにおける、尾静脈内に投与したファージ数に対する集積ファージ数の百分率比で下記表 3 に示す。また表 3 には、新生血管特異的ペプチドディスプレイファージの癌組織への親和性を、選別前のファージの回収率を 1 としたときの各ペプチド発現ファージの結合倍率にて併記する。
- 20

表 3

ファージ番号	回収率 (% 100mg組織)	親和性
No. 5	$2.90 \times 10^{-2}$	64.1
No. 6	$2.42 \times 10^{-2}$	53.5
No. 1	$1.12 \times 10^{-2}$	24.8
No. 2	$6.00 \times 10^{-3}$	13.3
No. 3	$3.61 \times 10^{-3}$	7.99
No. 9	$2.37 \times 10^{-3}$	5.24
No. 11	$2.19 \times 10^{-3}$	4.85
No. 4	$1.64 \times 10^{-3}$	3.62
No. 10	$1.28 \times 10^{-3}$	2.83
No. 7	$6.69 \times 10^{-4}$	1.48
No. 8	$4.87 \times 10^{-4}$	1.08
選別前ファージ	$4.52 \times 10^{-4}$	1.0

該表より、ファージ番号 No. 5、No. 6、No. 1、No. 2、No. 3 の順で癌組織への親和性が高いことがわかる。

#### (6) 新生血管特異的ペプチド発現ファージの親和性試

##### 験 - 2

マウスの系統を変えたとき、および腫瘍の株を変えたときにおいても、上記 (5) で選別されたペプチド発現

ファージが新生血管に特異的接着を示すかどうかを以下のとおり試験した。

即ち、Meth A肉腫細胞( $1 \times 10^6$ 個)を5週令のBALB/c雄性マウスの左腹部に移植し、担癌マウスを作製した。以下、上記(5)の方法と同じ方法で試験を行った。

その結果を表3と同様にして、下記表4に示す。

表 4

ファージ番号	回収率(% 100mg組織)	親和性
No. 1	$5.36 \times 10^{-3}$	45.0
No. 5	$4.29 \times 10^{-3}$	36.1
No. 6	$3.49 \times 10^{-3}$	29.3
選別前ファージ	$1.19 \times 10^{-4}$	1.0

該表より、ファージ番号No. 1、No. 5、No. 6の順で癌組織への親和性が高いことがわかる。

このように異なる種の腫瘍に対しても、多少の親和性の増減はあるもののファージ番号No. 1、No. 5およびNo. 6は、新生血管を形成する癌組織に対して高い親和性を示すことが明らかになった。

## 実施例2 本発明ペプチドの固相合成

全自動ペプチド合成機 (ACT 357、アドバンスト

ケムテック社製) を使用し、同社のプログラムに従い、  
Fmoc/NMP, HOBt法 [Fmoc:9-フルオレニルメトキシカルボ  
ニル、NMP:N-メチルピロリドン、HOBt:1-ヒドロキシ  
ペンゾトリアゾール] による各ペプチドの固相合成を以  
5 下のとおり実施した。

即ちまずC端フリー(OH)のペプチドを製造した。  
これらは配列番号1~12に示されるアミノ酸配列に従  
って、C端アミノ酸に相当するFmoc-アミノ酸-Alko樹脂  
0.25 mmolに、C端より2番目以降の各アミノ酸  
10 に相当するFmoc-アミノ酸を順次、合成プログラムに従い  
伸長反応させた。

またC端アミドの各ペプチドは、Fmoc-NH-SAL樹脂  
0.25 mmolにC端アミノ酸に相当するFmoc-アミノ  
酸を合成プログラムに従い縮合反応させ、その後、C端  
15 より2番目以降の各アミノ酸に相当するFmoc-アミノ酸を  
順次縮合反応させて鎖伸長を行った。

各反応終了後、プログラムに従って、N端Fmoc基の脱  
保護反応を行った。

かくして得られた各ペプチド樹脂をポリプロピレン製  
20 のミニカラム(アシスト社製)に回収し、メタノール洗  
浄後、真空で乾燥し、以下の操作に付してペプチドを樹  
脂から切り出し、側鎖の脱保護反応を行った。即ち、各

樹脂にリエージェント K (Reagent K, 82.5% TFA, 5% フェノール, 5% H<sub>2</sub>O, 5% チオアニソール (Thioanisole), 2.5% エタンジチオール) 2 ml を加え、ミニカラム中で 60 分間反応させた。

- 5      次いで、反応液を冷ジエチルエーテル 8 ml 中に滴下して反応を停止させ、同時にペプチドを沈殿させた。更に、ミニカラムを TFA 2 ml にて洗浄し、冷ジエチルエーテル 5 ml を追加し、遠心し、沈殿をジエチルエーテル 10 ml で 4 回洗浄後、約 5 ml の 50% アセトニ  
10   トリルでペプチドを可溶化し、凍結乾燥した。更に可溶化と凍結乾燥操作を 2 回繰り返して、所望の粗凍結乾燥品を得た。

- これをオクタデシルカラム (直径 20 X 250 mm, YMC 社製) を用いた逆相高速液体クロマトグラフィー  
15   (HPLC) により分画し、所望のペプチドを単離した。

尚、上記において用いた樹脂およびアミノ酸誘導体は、いずれも渡辺化学工業社製のものである。

- かくして単離された各ペプチドの同定を、アミノ酸配  
列分析およびマススペクトロメトリーによる分子量測定  
20   により行った。

### 実施例 3   合成ペプチドを用いた競合阻害実験

#### (1) ペプチドの合成

前記実施例 1 で得られた試験結果から、新生血管部位および癌組織への親和性の高い 3 種のペプチドにおける共通配列に着目し、X R P 構造を含む、配列番号 1、5 および 6 のペプチドに加えて、更に、配列番号 1 3 ~

- 5 1 6 に示すアミノ酸配列の各ペプチドを、実施例 2 に示すペプチド固相合成法に従って合成した。尚、以下の実施例においては、特に明示しない限り、本発明ペプチドとしては、かくして得られた C 端アミド構造のペプチドを利用した。

10 (2) 各ファージと 1 5 残基の合成ペプチドの競合阻害  
実験

- 実施例 1 (5) と同様の方法で、配列番号 1、5 および 6 に示すアミノ酸配列の合成ペプチドと N o. 1、  
N o. 5 および N o. 6 ファージを同時に投与した。尚、  
15 各ペプチドの合成は、実施例 2 に従った。

- 即ち、B 1 6 B L 6 黒色腫 ( $1 \times 10^6$  個) を 5 週齢の  
C 5 7 B L / 6 マウス (日本 S L C 社製) に移植 1 0 日  
後、麻酔下に担癌マウスに上記各合成ペプチド 0. 2 5  
 $\mu$ mol と各ファージ ( $1 \times 10^8$  コロニー形成単位) の混合  
20 液 0. 2 ml ずつをそれぞれ尾静脈内に投与し、癌組織  
内に集積したファージのコロニー形成単位を同様に測定  
した。



また、コントロールとして合成ペプチドを含まないファージ溶液（ $1 \times 10^8$ コロニー形成単位）を投与した群を設けた。

コロニー形成により、癌組織内の新生血管に集積したファージ数を算出し、合成ペプチドを同時に投与していないペプチド発現ファージの腫瘍集積率を基準値として、各合成ペプチドによるファージの集積阻害を評価した。

その結果を表 5 に示す。

表 5

10	ファージ番号	合成ペプチド	%投与量/100mg組織	集積阻害%
	No. 1	配列番号 1	$5.95 \times 10^{-3}$	5 5
		配列番号 5	$6.36 \times 10^{-3}$	5 2
		配列番号 6	$5.92 \times 10^{-3}$	5 5
		(無投与)	$1.33 \times 10^{-2}$	—
15	No. 5	配列番号 1	$1.35 \times 10^{-2}$	9
		配列番号 5	$5.08 \times 10^{-3}$	6 6
		配列番号 6	$3.61 \times 10^{-3}$	7 6
		(無投与)	$1.48 \times 10^{-2}$	—
20	No. 6	配列番号 1	$1.14 \times 10^{-2}$	—
		配列番号 5	$6.60 \times 10^{-3}$	4 3
		配列番号 6	$6.43 \times 10^{-3}$	4 4
		(無投与)	$1.15 \times 10^{-2}$	—

- 上記表より以下のことが判る。即ち、共通のアミノ酸配列(W R P)を有する合成ペプチド(配列番号5および6)は、No. 5およびNo. 6のファージに対して交差的に阻害活性を示し、新生血管部位に対する親和性に
- 5 上記共通配列W R Pが重要であることを示唆した。

一方、No. 1ファージの腫瘍集積は、いずれの合成ペプチドによっても同程度阻害された。

### (3) 各ファージと8残基または5残基の合成ペプチドの競合阻害実験

- 10 上記(2)と同様の方法により、合成ペプチド(配列番号5および6)に代えて、上記(2)で得られた4つの短鎖ペプチド(配列番号13~16)を用いて、これら各合成ペプチドと各ファージとを投与して、癌組織内に集積したファージのコロニー形成単位を同様に測定し、
- 15 短鎖合成ペプチドによるファージの集積阻害を評価した。コントロールとして合成ペプチドを含まないファージ溶液( $1 \times 10^8$ コロニー形成単位)を投与した群を設けた。

その結果を図1および図2に示す。

- 各図において、縦軸はファージ集積%を、横軸はファージNo.を示す。図1中、白抜き棒は、合成ペプチド無投与のファージのみ投与群(コントロール群)を、斜線を付した棒は配列番号13に示す短鎖合成ペプチド投
- 20

与群を、また黒塗り棒は配列番号 1 4 に示す短鎖合成ペプチド投与群を、それぞれ示す。

図 1 より、配列番号 5 と配列番号 6 に示すアミノ酸配列の合成ペプチドの共通配列である W R P を含む 8 残基の短鎖合成ペプチド（配列番号 1 3 および 1 4）は、それぞれに対応する 1 5 残基のペプチド発現ファージの腫瘍集積を抑制した。その阻害活性は 1 5 残基の合成ペプチドを用いたものを上回るものであった。また、両者が交差反応性を示したことから、共通配列 W R P の重要性が示唆され、更に短鎖化することも可能と考えられる。

また、図 2 中、白抜き棒は合成ペプチド無投与のファージのみ投与群（コントロール群）を、黒塗り棒は配列番号 1 5 に示す短鎖合成ペプチド投与群（ファージ No. 5 使用の場合）を、また斜線を付した棒は配列番号 1 6 に示す短鎖合成ペプチド投与群（ファージ No. 6 使用の場合）を、それぞれ示す。

該図 2 から、更に短鎖化された配列番号 1 5 および 1 6 に示すペプチド（5 残基）の場合も、共通配列 W R P を有し、それぞれに対応する 1 5 残基のペプチド発現ファージの腫瘍集積を同様に抑制することが判る。

#### 実施例 4 腫瘍増殖抑制作用 1

##### (1) デンドリマーペプチドの合成

ペプチドの腫瘍増殖抑制作用を検討するに際して、投与されるペプチドの安定性および活性の増強の見込まれる多抗原性ペプチド(multiple antigen peptide: MAP)、即ちデンドリマーペプチドを用いて検討した。デンドリマーペプチドの合成は、Fmoc-MAP-Alko樹脂を用いることにより、実施例2に示される固相合成と同一の方法にて実施した。また、デンドリマーペプチド合成のための樹脂としては、Fmoc<sub>8</sub>-Lys<sub>4</sub>-Lys<sub>2</sub>-Lys-βAla-Alko樹脂(Fmoc-MAP-Alko樹脂、渡辺化学工業社製)を用いた。

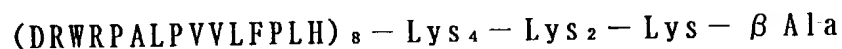
10 合成ペプチドとして、配列番号1、5および6に示すアミノ酸配列のもの(実施例2で得たもの)をそれぞれ用いて得られたデンドリマーの構造は、アミノ酸残基を一文字表示により示せば、それぞれ以下の通りである。

(デンドリマーペプチド)

15 (1)配列番号1のペプチドのデンドリマーペプチド:



(2)配列番号5のペプチドのデンドリマーペプチド:



(3)配列番号6のペプチドのデンドリマーペプチド:

20 (ASSSYPLIHWRPWAR)<sub>8</sub> - Lys<sub>4</sub> - Lys<sub>2</sub> - Lys - βAla

(2)デンドリマーペプチドの血管新生抑制効果

Meth A肉腫細胞(5×10<sup>6</sup>細胞/ml)を5週齢雄性

BALB/c マウス（日本 SLC 社製）の左腹側部に  
0.2 ml 皮下投与して固形癌担癌マウスを作成した。  
上記肉腫移植 6～10 日後、担癌マウスに移植後癌の直  
径が 4 mm に到達した日を 1 日目とし、1～11 日目に  
5 コントロールとして蒸留水（D. W.）を、また上記(1)  
～(3)の各デンドリマーペプチドを、それぞれ 20 mg /  
kg / 日連日皮下投与した（各群 4 匹のマウスを用いた）。

各デンドリマーペプチドの抗腫瘍効果は、移植 6 日後  
から腫瘍増殖、副作用の一指標として体重変化および生  
10 存日数を調べると共に、癌の短径および長径を測定し、  
以下に示す式に従って癌容積を算出した。該計算式によ  
り算出される癌容積は、癌を摘出して量った癌重量とき  
わめて高い相関性を示す ( $r^2=0.980$ )。

$$\text{癌容積} = 0.4 \times a \times b^2 \quad (a: \text{長径} \quad b: \text{短径})$$

15 その結果を図 3 に示す。

図 3 において縦軸は癌容積 ( $\text{cm}^3$ ) を、横軸は日数 (日)  
を示し、図中(1)は上記(1)のデンドリマーペプチド投与  
群を、(2)は上記(2)のデンドリマーペプチド投与群を、  
(3)は上記(3)のデンドリマーペプチド投与群を、(4)は蒸  
20 留水投与群をそれぞれ示す。

図 3 より、蒸留水の投与と比較して、配列番号 1、5  
および 6 に示すアミノ酸配列ペプチドのデンドリマーペ

プチドの投与によれば、著しい腫瘍増殖抑制作用が奏されることが明らかとなった。この結果より、配列番号 1、5 および 6 に示すアミノ酸配列のペプチドは、デンドリマーペプチドの形態で、優れた腫瘍増殖抑制効果を奏することが確認された。

#### 実施例 5 ペプチド修飾リボソームの体内分布

本発明血管新生特異的ペプチド、特に W R P 配列および P R P 配列を含むペプチドで修飾したリボソームは、その体内分布が腫瘍の新生血管および／または腫瘍周辺部位に特異的であれば、所望の抗癌剤や抗癌活性を有するサイトカインなどを含む医薬組成物として癌に対するアクティブターゲティングを行うことが可能な D D S 製剤とすることができる。

そこで、本例では、W R P 配列および P R P 配列を含む 5 残基からなるペプチドの N 末端にステアリン酸を結合させて、リボソーム化して調製したリボソームが標的とする腫瘍に集積するか否かを検討した。

##### (1) リボソーム分散液の調製

リボソーム分散液の調製のために本発明血管新生特異的ペプチド（部分ペプチド、配列番号 1 5 : 配列番号 5 の部分ペプチド、配列番号 1 6 : 配列番号 6 の部分ペプチドおよび配列番号 1 7 : 配列番号 1 の部分ペプチドの

N 端にAlaを付加したもの) のステアリン酸誘導体を実施例 2 の方法で合成した。

次いで、脂質 DSPC (ジステアロイルホスファチジルコリン：日本精化株式会社製)、コレステロール(シグマ社製)および上記 3 種の本発明新生血管特異的ペプチド (部分ペプチドのステアリン酸誘導体) のそれぞれを、モル比が 10 : 5 : 4 となる割合で含むクロロホルム溶液を調製した。

即ち、75  $\mu$ l の 100 mM DSPC、37.5  $\mu$ l のコレステロール、30  $\mu$ l の本発明ペプチドおよび [オレート-1- $^{14}$ C] 標識コレステロールオレート (555 KBq：アマシャム社製) を加えて、モル比が 10 : 5 : 4 となる割合で含むクロロホルム溶液を調製した。次いで前記調製液をナス型フラスコに入れ、ロータリーエバポレーターで減圧条件下にクロロホルムを除去して脂質薄膜を調製した。さらに減圧下にクロロホルムを完全に除去し、乾燥させた。60 分間真空乾燥した後、0.3 M グルコースで水和した (DSPC 濃度；5.0 mM)。

通常、ここで、0.3 M グルコースの代わりに、有効成分としてグリセリンなどで等張化した 5-FU、ドクソルビシンなどの抗癌物質や抗腫瘍活性成分を添加する

- のであり、抗腫瘍活性成分として特定DNA断片を含むプラスミドあるいは蛋白質の場合は、ダルベッコのリン酸緩衝生理食塩液(PBS)-Mg, Ca含有液などを添加して調製するか、あるいはリポソーム調製後にリモートローディング法によりアドリアマイシンなどの抗癌剤を封入するのであるが、本発明の新生血管特異的ペプチドはそれ自体、実施例3に示されるように抗腫瘍効果を有するので、以下のように、続く調製ステップでは、抗癌物質や抗腫瘍活性成分は加えないこととした。
- 10 上記調製液について、凍結と70℃加温による融解を3回繰り返した後、調製液を温浴型の超音波処理装置(商品名:ULTRASONIK250:ラボスコ株式会社製)にて10分間超音波処理して攪拌を行った。次いでエクストルーダー(ライベックス社製)にて、100nmの孔径を持つ
- 15 ポリカーボネート膜(ヌクリポアポリカーボネート:コースター社製)を3回通過させ、目的とする本発明新生血管特異的ペプチド(部分ペプチド)のN末端にステアリン酸が結合した分子を含むリポソーム(分散液)を得た。このものにおいて部分ペプチドはリポソームの表面を修飾する形となっている。
- 20

かくして、DSPC、コレステロールおよび本発明新生血管特異的ペプチド(3種の部分ペプチド、配列番号



15 : R W R P A、 配列番号 16 : H W R P W および配  
列番号 17 : A P R P G) を 1. 5 m l 中に 7. 5  $\mu$  モル、  
3. 7 5  $\mu$  モルおよび 3  $\mu$  モルとなるようにそれぞれ有  
するリボソーム分散液を得た。

5 (2) 担癌マウスのリボソームの体内分布

Meth A肉腫細胞 ( $1 \times 10^6$  個 / 0. 2 m l) を 5 週齢の  
B A L B / c マウスの腹側皮下に移植し、固形腫瘍を形  
成させた。10 日後、麻酔下で担癌マウスに上記 (1) で調  
製した 3 種のリボソーム分散液 0. 2 m l / マウスずつ  
10 を尾静脈内に投与し、マウスの癌組織、各臓器への体内  
分布を調べた。尚、コントロールとして、合成ペプチド  
を含まないリボソーム分散液を投与した。試験した担癌  
マウスは、各群 2 ~ 3 匹であった。

被検液投与後、3 時間後に担癌マウスを脱血後、頸椎  
15 脱臼にて屠殺した後、解剖し、血液、癌組織、心臓、肺、  
肝臓、脾臓および腎臓の各臓器を採取した。各臓器重量  
を測定した。血液はエッペンドルフチューブに移し、  
3 0 0 0 rpm、5 分間で遠心分離後、得られた血清 5 0  
 $\mu$  l をバイアル瓶に保存した。また、各臓器は 1 0 0  
20 m g 程度になるように切断し、同様にバイアル瓶に入れ、  
臓器の重量を測定後保存した (各臓器は 2 ヶ所より取得し  
た)。次いでバイアル瓶の中の各臓器をミンチし、1 m l

の組織溶解液（ソルバブル：NEN Research Productions 社製）を加えた後、50℃インキュベーター（パーソナル DX：タイテック株式会社製）で一晩放置した。翌日、消泡剤としてイソプロパノール（和光純薬工業株式会社製）を0.5ml添加した後、脱色剤として過酸化水素を0.5ml加え、数時間放置した。

その後、シンチレーター（ハイオニックフロー：パッカーカード・バイオサイエンス社製）を10ml添加し、よくバイアル瓶を振盪し、さらに一晩放置した。被検物を液体シンチレーションカウンター（LSC-3100：アロカ社製）で、腫瘍組織を含む各臓器におけるペプチドで修飾されたりボソームの生体分布測定した。なお、測定はブランクおよびリボソーム50μlにシンチレーター（ハイオニックフロー：パッカーカード・バイオサイエンス社製）10mlを加えたものを各2本用意した。

その結果を図4に示す。該図において、数値は腫瘍組織100mg中における投与したペプチド修飾リボソームの回収量（%投与量）を示す。

図から分かるように、本発明新生血管特異的ペプチド（部分ペプチド、配列番号15：配列番号5の部分ペプチド；RWRPA、配列番号16：配列番号6の部分ペプチド；HWRPWおよび配列番号17：配列番号1の部

分ペプチド；A P R P G)で修飾されたりポソームの腫瘍内分布は、いずれもコントロールに比べて、有意に高いことを示した(図中、★印はコントロールに対して有意( $p < 0.05$ )を示す)。

5     また、これら本発明血管新生特異的ペプチドにて修飾されたりポソームは、かかるペプチドで修飾していないリポソーム(コントロール、ペプチド無添加)と比較して、血中滞留性が上昇する傾向を示すことも明らかとなった。

10    尚、上記各ペプチドの他の臓器への分布に関しては、全体的にはコントロールと類似した傾向を示し、脾臓、肺および肝臓においては、若干低下する傾向が認められた。この傾向は特に配列番号17のペプチドで顕著であった。

#### 15    実施例6    腫瘍増殖抑制作用2

(1) 配列番号1のペプチドのデンドリマーの腫瘍増殖抑制作用についての用量依存性効果の検討

実施例4の(1)で合成された配列番号1のペプチドのデンドリマーペプチドの10mg/kg×2/日および20mg/kg×2/日と、配列番号1の配列を任意の配列に入れ変えたペプチドのデンドリマーペプチド(配列番号18)の20mg/kg×2/日およびコン

20

トロールとして蒸留水 (DW) のそれぞれを、実施例 4  
の (2) の方法に準じて、腫瘍細胞移植後 1 - 10 日ま  
で皮下投与し、腫瘍増殖抑制作用を検討した。実験に供  
したマウスは各群 4 ~ 6 匹である。得られた結果を図 3  
5 と同様にして図 5 (縦軸: 腫瘍容量 ( $\text{cm}^3$ )、横軸: 腫  
瘍細胞移植後日数 (日)) に示す。

図中、白抜丸印は、デンドリマーペプチドの  $10 \text{ mg} / \text{kg} \times 2 / \text{日群}$ 、黒丸印は、デンドリマーペプチドの  
 $20 \text{ mg} / \text{kg} \times 2 / \text{日群}$ 、白抜き四角印は、任意に配  
10 列を入れ変えたペプチドのデンドリマーペプチドの  $20$   
 $\text{mg} / \text{kg} \times 2 / \text{日群}$  および黒四角印は、蒸留水投与群  
をそれぞれ示す。

図 5 より、配列番号 1 の配列を任意の配列に入れ変え  
たペプチドのデンドリマーペプチド投与群および蒸留水  
15 投与群に比較して、配列番号 1 のデンドリマーペプチド  
投与群は、用量依存的に腫瘍増殖抑制作用を示すことが  
分かる。

(2) 配列番号 1 に関連する短鎖ペプチドの腫瘍増殖抑制  
効果の検討

20 この試験では、下記表 6 に示されるアミノ酸配列の、  
配列番号 1 の部分配列またはその部分配列を含む 3 種の  
短鎖ペプチドを実施例 2 の方法に準じたペプチドの固相

合成法により合成して使用した。

表 6

アミノ酸配列	備 考
配列番号 17	配列番号 1 の 1 - 4 位の N 端に Ala を付加した 5 残基ペプチド
配列番号 19	配列番号 1 の 1 - 8 位を含む 12 残基ペプチド
配列番号 20	配列番号 1 の 8 - 15 位の 8 残基ペプチド

合成した 3 種の各短鎖ペプチドおよびコントロールとして生理食塩水のそれぞれを実施例 4 の (2) の方法に準じて、腫瘍細胞移植後 1 - 10 日まで皮下投与し、腫瘍増殖抑制作用を検討した。得られた結果を、図 3 と同様にして図 6 に示す。

図中、白抜丸印は生理食塩水投与群、黒丸印は配列番号 19 のペプチド投与群、白抜き四角印は配列番号 17 のペプチド投与群および黒四角印は配列番号 20 のペプチド投与群をそれぞれ示す。

図 6 より、配列番号 1 の配列の前半部にある P R P を含むペプチドの投与群（配列番号 19 のペプチド投与群および配列番号 17 のペプチド投与群）において、腫瘍の増殖抑制傾向が確認された。

(3) 配列番号 5 に関連する短鎖ペプチドの腫瘍増殖抑制

## 効果の検討

下記表 7 に示される、配列番号 5 の全配列を有するペプチド、配列番号 5 の 2 種の部分配列を有するペプチド（配列番号 1 3 のペプチドおよび配列番号 2 1 のペプチド）および配列番号 5 の配列を任意の配列に入れ換えたペプチド（配列番号 2 2）を、それぞれ実施例 2 の方法に準じたペプチドの固相合成法により合成して、試験に供した。

表 7

10	アミノ酸配列	備 考
	配列番号 5	1 5 残基 ペプチド
	配列番号 1 3	配列番号 5 の 1 - 8 位の 8 残基 ペプチド
	配列番号 2 1	配列番号 5 の 8 - 1 5 位の 8 残 基 ペプチド
15	配列番号 2 2	配列番号 5 の配列を任意に入れ 換えた 1 5 残基 ペプチド

上記で合成した各ペプチドのそれぞれ 20 mg / kg / 日またはコントロールとしての蒸留水（DW）を、実施例 4 の（2）の方法に準じて、腫瘍細胞移植後 4 - 9 日まで皮下投与し、腫瘍増殖抑制作用を検討した。実験に供したマウスは各群 3 ~ 5 匹である。結果を図 3 と同様にして図 7 に示す。

図中、白抜丸印は蒸留水投与群、黒丸は配列番号 5 のペプチド投与群、白抜き四角印は配列番号 2 2 のペプチド投与群（比較群、配列番号 5 の任意配列の 1 5 残基のペプチド投与群）、黒四角印は配列番号 1 3 のペプチド投与群および白抜き三角印は配列番号 2 1 のペプチド投与群をそれぞれ示す。

図 7 より、配列番号 5 の全配列のペプチド並びに前半部および後半部の各短鎖ペプチドはいずれも腫瘍増殖抑制作用を有することが確認された。

#### 10 (4) 配列番号 5 のペプチドに関連する短鎖ペプチド (5 残基) の腫瘍増殖抑制効果の検討

上記 (3) の結果から、腫瘍増殖抑制効果の活性に影響を与えるペプチド配列をさらに検討するために、下記表 8 に示される、配列番号 5 の 3 種の部分配列を実施例 2 の方法に準じたペプチドの固相合成により合成して、本試験に供した。

表 8

アミノ酸配列	備 考
配列番号 2 3	配列番号 5 の 8 - 1 2 位ペプチド
配列番号 2 4	配列番号 5 の 1 1 - 1 5 位ペプチド
配列番号 2 5	配列番号 5 の 5 - 9 位ペプチド

上記で合成した各ペプチドのそれぞれ 20 mg / kg / 日またはコントロールとして生理食塩水を、実施例 4 の (2) の方法に準じて、腫瘍細胞移植後 1 - 10 日まで皮下投与して腫瘍増殖抑制作用を検討した。実験に供  
5 したマウスは各群 4 ~ 5 匹である。結果を図 3 と同様に  
して図 8 に示す。

図中、白抜丸印は配列番号 23 のペプチド投与群、黒丸は配列番号 24 のペプチド投与群、白抜き四角印は配列番号 25 のペプチド投与群および黒四角印は生理食塩  
10 水投与群をそれぞれ示す。

図 8 より、配列番号 5 の 11 - 15 位の 5 残基の短鎖ペプチドにおいても抗腫瘍活性があることが確認された。

(5) 配列番号 6 のペプチドに関連する短鎖ペプチドの腫瘍増殖抑制効果の検討

15 上記 (3) と同様に、配列番号 6 のペプチドに関連する短鎖ペプチドの腫瘍増殖抑制効果に影響を与えるペプチド配列を検討するために、下記表 9 に示される、配列番号 6 のペプチド、その 3 種の部分配列 (配列番号 26、  
14 および 16) および配列番号 6 の配列を任意に入れ  
20 換えた配列の比較ペプチド (配列番号 27) を、実施例 2 の方法に準じたペプチド固相合成法により合成して、  
本試験に用いた。



表 9

アミノ酸配列	備 考
配列番号 6	15 残基ペプチド
配列番号 14	配列番号 6 の 8 - 15 位の 8 残基ペプチド
配列番号 16	配列番号 6 の 9 - 13 位の 5 残基ペプチド
配列番号 26	配列番号 6 の 1 - 8 位の 8 残基ペプチド
配列番号 27	配列番号 6 の配列を任意に入れ換えた 15 残基ペプチド

- 10 上記で合成した各ペプチドのそれぞれ 20 mg / kg / 日またはコントロールとして蒸留水を、実施例 4 の (2) の方法に準じて、腫瘍細胞移植後 1 - 10 日まで皮下投与して腫瘍増殖抑制作用を検討した。実験に供したマウスは各群 5 ~ 6 匹である。結果を図 3 と同様にして図 9
- 15 に示す。

図中、白抜丸印は蒸留水投与群、黒丸印は配列番号 6 のペプチド投与群、白抜き四角印は配列番号 26 のペプチド投与群、黒四角印は配列番号 14 のペプチド投与群、白抜き三角印は配列番号 16 のペプチド投与群および黒

20 三角印は配列番号 27 のペプチド投与群をそれぞれ示す。

図 9 より、WRP 配列を含む配列の短鎖ペプチドにおいて抗腫瘍活性があることが確認された。

(6) W R P 配列を含む短鎖ペプチドおよびW R P 配列を  
1 残基置換した配列を含む短鎖ペプチドの腫瘍増殖  
抑制効果の検討

上記(5)の結果から、さらにW R P 配列の抗腫瘍活性に  
5 対する重要性を検討するために、下記表 1 0 に示す配列  
番号 5 由来、配列番号 6 由来および配列番号 5 と 6 の両  
者の配列由来の 3 ～ 4 残基のW R P 配列を含むペプチド  
およびW R P 配列中の各アミノ酸残基をそれぞれアラニ  
ン(A:Ala)で置換した 5 残基ペプチドを、実施例 2 の方  
10 法に準じたペプチドの固相合成により合成して、本試験  
に供した。

表 1 0

アミノ酸配列	備 考
配列番号 2 8	配列番号 5 の 2 - 5 位 4 残基ペプチド
15 配列番号 2 9	配列番号 6 の 9 - 1 2 位 4 残基ペプチド
配列番号 3 0	配列番号 5 の 3 - 6 位 4 残基ペプチド
配列番号 3 1	配列番号 6 の 1 0 - 1 3 位 4 残基ペプチド
配列番号 3 2	配列番号 5 と 6 に共通の 3 残基ペプチド
配列番号 3 3	配列番号 1 6 の W を A に置換したペプチド
20 配列番号 3 4	配列番号 1 6 の R を A に置換したペプチド
配列番号 3 5	配列番号 1 6 の P を A に置換したペプチド

上記で合成した各ペプチドのそれぞれ 20 mg / kg / 日またはコントロールとして蒸留水または生理食塩水のそれぞれを、実施例 4 の (2) の方法に準じて、腫瘍細胞移植後 1 - 10 日まで皮下投与し、腫瘍増殖抑制作用を  
5 検討した。実験に供したマウスは各群 5 ~ 6 匹である。結果を図 3 と同様にして、図 10 (配列番号 28 ~ 32 の各ペプチドの結果) および図 11 (配列番号 33 ~ 35 の各ペプチドの結果) に示す。

図 10 中、白抜菱形印は配列番号 32 のペプチド投与  
10 群、黒丸は蒸留水投与群、白抜き四角印は配列番号 28 のペプチド投与群、黒四角印は配列番号 29 のペプチド投与群、白抜き三角印は配列番号 30 のペプチド投与群および黒三角印は配列番号 31 のペプチド投与群をそれぞれ示す。

15 図より、WRP 配列を含む各配列の短鎖ペプチドは、抗腫瘍活性を有することが確認され、その抗腫瘍活性の強さは、配列番号 28 のペプチド = 配列番号 29 のペプチド > 配列番号 30 のペプチド = 配列番号 31 のペプチド > 配列番号 32 のペプチドであることが判明した。

20 また、図 11 中、白抜丸印は生理食塩水投与群、黒丸は配列番号 33 のペプチド投与群、白抜き四角印は配列番号 34 のペプチド投与群および黒四角印は配列番号

35 のペプチド投与群をそれぞれ示す。

図11より、WRP配列を含まない配列を有する短鎖ペプチドにおいては、抗腫瘍活性は認められないことが判った。

- 5     以上の結果から、抗腫瘍活性を有するためにはWRP配列が重要であり、該WRP配列を含む少なくとも4～5残基以上の配列からなる短鎖ペプチドが抗腫瘍活性を有することが確認された。

#### 実施例7   ペプチド修飾リポソームの検討

- 10   (1)   ペプチド修飾リポソームによる腫瘍増殖抑制効果の  
      検討

      実施例5の(1)に準じて配列番号15、16および17の配列を有する各ペプチド修飾リポソームを調製し、それらの腫瘍増殖抑制作用を検討した。但し、各ペプチド  
15   修飾リポソームの調製の際、〔オレート-1-<sup>14</sup>C〕標識コレステロールオレートの添加は行わなかった。

      上記で作成した各ペプチド修飾リポソーム分散液のそれぞれ20mg/kg/日またはコントロールとして生理食塩水およびコントロールリポソーム（ペプチド無添  
20   加）のそれぞれを、実施例4の(2)の方法に準じて、腫瘍細胞移植後4、6および8日目の3回、皮下投与して、各ペプチド修飾リポソームの腫瘍増殖抑制作用を検討し

た。実験に供したマウスは各群 5 匹である。結果を図 3 と同様にして図 1 2 に示す。

5 図中、白抜菱形印はコントロールリボソーム投与群、白抜四角印は生理食塩水投与群、白抜丸印は配列番号 1 7 のペプチド修飾リボソーム投与群、白抜き三角印は配列番号 1 5 のペプチド修飾リボソーム投与群および黒四角印は配列番号 1 6 のペプチド修飾リボソーム投与群をそれぞれ示す。

10 図 1 2 より、抗腫瘍効果の高さは、配列番号 1 5 のペプチド修飾リボソーム > 配列番号 1 6 のペプチド修飾リボソーム > 配列番号 1 7 のペプチド修飾リボソームの順であることが判った。また図 1 2 より、WRP 配列を含む配列の短鎖ペプチドが抗腫瘍活性のより強いことが確認された。

15 (2) ペプチド修飾リボソームにおけるペプチド組成の腫瘍組織親和性への影響

実施例 5 のペプチド修飾リボソームの体内分布試験の結果から、配列番号 1 7 の配列を有するペプチドで修飾されたりボソームが最も腫瘍特異的であったことから、  
20 このペプチドのリボソーム中のモル比を変化させて、腫瘍に対する特異性の変化を検討した。

即ち、実施例 5 の (1) に準じてリボソーム分散液を調製

した。その際、脂質DSPC（ジステアロイルホスファチジルコリン：日本精化株式会社製）、コレステロール（ジグマ社製）および本発明新生血管特異的ペプチド（配列番号17：配列番号1の部分ペプチドのN端に  
5 Alaを付加したもの）のステアリン酸誘導体のモル比が10：5：2（PRP-20という）、10：5：1（PRP-10という）、10：5：0.5（PRP-5という）および10：5：0（コントロールリボソーム、対照という）となる割合をそれぞれ採用した。リボ  
10 ソームの濃度はDSPCが5mMとなるようにし、サイズは100nmに調製した。

続いて、実施例5の(2)に準じて、上記で調製された各リボソームの腫瘍組織への親和性を検討した。試験した担癌マウスは各群2～3匹である。

15 その結果を、図4と同様にして図13（縦軸：%投与量／100mg組織、横軸：各供試リボソーム）に示す。

図13から、本発明リボソーム製剤の有効成分のひとつである新生血管特異的ペプチドの量を少なくとも5モル%にまで低下させても、所望の腫瘍への親和性には影  
20 響しないことが判明した。

### (3) ペプチド修飾リボソームの血清中安定性の検討

上記(2)で調製したペプチド修飾リボソームを用いて、

それらの血清中での安定性を以下の通り凝集度を測定することにより検討した。

即ち、各リポソーム分散液 0.15 ml、未非働化ウシ胎児血清（JRHバイオサイエンス社製）0.75 ml および 0.3 M グルコース溶液 0.6 ml の混合液を調製した。コントロールとして、リポソーム分散液 0.15 ml および 0.3 M グルコース溶液 1.35 ml の混合液を調製した。上記の混合液をそれぞれ 37℃ で 30 分間インキュベートし、450 nm における吸光度を測定した（ベックマン社製、DU-70 スペクトロメーター使用）。

かくして求めた測定値より各リポソーム分散液の凝集度を下式に従い算出した。

凝集度 = 血清存在下 450 nm における吸光度（リポソーム分散液の濁度） / 血清非存在下（0.3 M グルコース溶液中）450 nm における吸光度（リポソーム分散液の濁度）

得られた血清中安定性（凝集度）の結果を、図 14（縦軸：凝集度、横軸：各供試リポソーム）に示す。

図 14 から、本発明のリポソーム製剤の血清中の安定性は、本発明のリポソーム製剤の有効成分のひとつである新生血管特異的ペプチドの量が少なくとも 10 モル% 以下においては凝集に影響しないことが確認された。

実施例 8 新生血管特異的ペプチドと抗癌剤とを有効成分として含有するリポソーム製剤による抗腫瘍効果の検討

実施例 7 の (2) で得た本発明ペプチド修飾リポソームの

5 腫瘍組織に対する親和性への影響試験の結果を基に、5  
モル%の配列番号 17 のペプチドを含むペプチド修飾  
リポソームに、抗癌剤として知られているアドリアマイ  
シンを封入した下記リポソームについてその抗腫瘍効果  
を検討した。

10 (1) アドリアマイシン (ADR) 封入ペプチド修飾リポソーム  
の調製

リポソーム溶液の調製のために本発明新生血管特異的  
ペプチド (部分ペプチド、配列番号 17 : 配列番号 1 の  
部分ペプチドの N 端に Ala を付加したもの) のステアリン

15 酸誘導体を実施例 2 の方法で合成した。

次いで、脂質 DSPC (ジステアロイルホスファチジ  
ルコリン : 日本精化株式会社製)、コレステロール (シ  
グマ社製) および上記の本発明新生血管特異的ペプチド  
(部分ペプチドのステアリン酸誘導体) を、モル比が

20 10 : 5 : 0.5 となる割合で含むクロロホルム溶液を  
調製した。即ち、400  $\mu$ l の 100 mM DSPC、  
200  $\mu$ l の 100 mM コレステロールおよび 100



$\mu$  l の 20 mM 本発明ペプチドを加えて、モル比が 10 : 5 : 0.5 となる割合で含むクロロホルム溶液を調製した。次いで前記調製液をナス型フラスコに入れ、ロータリーエバポレーターで減圧条件下にクロロホルムを除去して脂質薄膜を調製した。さらに減圧下にクロロホルムを完全に除去して乾燥させた。60 分間真空乾燥した後、1 ml の 0.3 M クエン酸溶液 (pH 4.0) で水和した (DSPC 濃度; 40 mM)。

上記調製液について、凍結と 70℃ 加温による融解を 3 回繰り返した後、調製液を温浴型の超音波処理装置 (商品名: ULTRASONIK250: ラボスコ株式会社製) にて 10 分間超音波処理して攪拌を行った。次いでエクストルーダー (ライベックス社製) にて、100 nm の孔径を持つポリカーボネート膜 (ヌクレオポアポリカーボネート: コーンスター社製) を 3 回通過させ、目的とする本発明新生血管特異的ペプチド (部分ペプチド) の N 末端にステアリン酸が結合した分子を含むリポソーム (分散液) を得た。このものにおいて部分ペプチドはリポソームの表面を修飾する形となっている。

リポソーム分散液に 0.5 M 炭酸ナトリウム溶液を加え、リポソーム外水相の pH を 7.5 に調整した。次いで 20 mM HEPES 緩衝液で希釈し、全量 2.0 ml

とした。さらに、 $10\text{ mg/ml}$  アドリアマイシン（シグマ社製）溶液を $0.58\text{ ml}$  加え、 $60^\circ\text{C}$  で1時間インキュベーションし、リポソーム内水層にアドリアマイシンを封入した。

5 上記調製液を5分間遠心（日立工機社製、CS120EX； $100,000\text{ g}$ ）してリポソームを沈殿させ、封入されなかったアドリアマイシンを含む上清を除去した。沈殿を $1\text{ ml}$  の $0.3\text{ M}$  グルコース溶液で再分散し、以下に記述した定量法によりアドリアマイシン内封量を算出した。

10 次いで、アドリアマイシンが $1.1\text{ mg/ml}$ （ $10\text{ mg/kg}$ ）となるように希釈し、アドリアマイシンを封入した本発明新生血管特異的リポソーム（分散液）を得た。

かくして、DSPC、コレステロールおよび本発明新生血管特異的ペプチド（配列番号17）を $5.5\text{ ml}$  中に $40\text{ }\mu\text{M}$ 、 $20\text{ }\mu\text{M}$  および $2\text{ }\mu\text{M}$  となるようにそれぞれ有するリポソーム（分散液）を得た（DSPC濃度； $7.3\text{ mM}$ ）。

## (2) アドリアマイシンの定量

### 20 (a) アドリアマイシン量の検量線の作成

$0\text{ }\mu\text{l}$ 、 $100\text{ }\mu\text{l}$ 、 $200\text{ }\mu\text{l}$  および $400\text{ }\mu\text{l}$  の $0.2\text{ mg/ml}$  アドリアマイシン溶液、 $900\text{ }\mu\text{l}$ 、

800  $\mu$ l、700  $\mu$ l および 500  $\mu$ l の 0.3 M グルコース溶液および 100  $\mu$ l の 10%還元トライトン X-100 (reduced Triton X-100, アルドリッチ社製) をそれぞれ混合後、480 nmにおける吸光度を測定し  
5 (ベックマン社製、DU-70スペクトロメーター)、検量線を得た。

(b) リポソーム内水層のアドリアマイシンの定量

10 10  $\mu$ l のリポソーム分散液、100  $\mu$ l の 10%還元トライトン X-100 および 890  $\mu$ l の 0.3 M グルコース溶液を混合後、60℃にて加温し、480 nmにおける吸光度を測定した。

かくして求めた測定値および検量線よりアドリアマイシンのリポソーム内水層への封入率を算出したところ、90%以上の内封率であった。

15 (3) アドリアマイシン封入本発明ペプチド修飾リポソームの抗腫瘍効果

Meth A肉腫細胞 ( $1 \times 10^6$  細胞/マウス) を5週齢雄性 BALB/c マウス (日本 SLC 社製) の左腹側部に皮下投与して固形癌担癌マウスを作成した。移植した日を Day  
20 1 とし、6、9 および 12 日目に溶媒コントロールとして、0.3 M グルコース溶液 (溶媒)、アドリアマイシン (ADR) 封入コントロールリポソーム (本発明の新生血

管特異的ペプチドを含まない抗癌剤が封入されたりボソーム)、抗癌剤のADRが15mg/kg(マウス)となるように0.3Mグルコースに溶解したフリーADR溶液および上記(1)で調製したADRを封入した本発明血管  
5 新生特異的ペプチド修飾リボソームのそれぞれを尾静脈内に投与した。試験に供した担癌マウスは各群5匹とした。

投与した各薬物の抗腫瘍効果は、腫瘍移植5日後から腫瘍増殖の指標としての腫瘍容積、副作用の指標としてのマウス体重変化および生存日数を、実施例4の  
10 (2)と同様にして調べることにより評価した。

結果を図15に示す。

図中、縦軸は腫瘍容積を、横軸に腫瘍移植後の日数を示す。また図中、(1)は溶媒投与群、(2)はADR封入コントロールリボソーム投与群、(3)はフリーADR溶液投与群および(4)はADRを封入した本発明新生血管特異的  
15 ペプチド修飾リボソーム投与群をそれぞれ示す。

図15から分かるように、リボソームに封入されなかったフリーのアドリアマイシン(ADR)溶液を投与した群(群(3))では、6、9および12日の3回の投与によりマウスが全例死亡したのに対して、リボソームに封入されたアドリアマイシンの投与群(群(2))では、マウ  
20

スの死亡は回避された。また、アドリアマイシンを封入した本発明新生血管特異的ペプチド修飾リボソームの投与群（群（4））では、移植された腫瘍の増殖が著しく抑制されることが判った。

- 5      この結果より、本発明の新生血管特異的ペプチドを有効成分として含むペプチド修飾リボソームに抗癌剤を封入したりリボソーム製剤では、封入された抗癌剤の副作用が軽減され且つ腫瘍増殖抑制効果が著しく増強されることが確認された。

10                      産業上の利用可能性

- 本発明によれば、新規な新生血管特異的ペプチドが提供され、該新生血管特異的ペプチドの利用によれば、癌組織の新生血管内皮細胞のリガンドとしての分子医薬として、標的組織に選択的に薬物送達を可能とするDDS
- 15   製剤への応用が可能であり、癌治療効果の向上に寄与する癌診断剤、癌診断方法、癌治療方法等の提供が可能となる。

## 請 求 の 範 囲

1. 新生血管に選択的に帰巢し、以下の(a)および(b)のいずれかである新生血管特異的ペプチド：
  - (a) 配列番号 1 から 11 で示されるアミノ酸配列のいずれかを有するペプチドまたはそのデンドリマー、
  - (b) 上記(a)に示されるアミノ酸配列において1若しくは複数個のアミノ酸が置換、欠失若しくは付加により改変されたアミノ酸配列からなり、かつ新生血管に親和性を有するペプチドまたはそのデンドリマー。
2. 配列番号 1 から 11 で示されるアミノ酸配列のいずれかを有するペプチドまたはそのデンドリマーである請求項 1 に記載の新生血管特異的ペプチド。
3. 配列番号 1、5 および 6 で示されるアミノ酸配列のいずれかを有するペプチドまたはそのデンドリマーである請求項 2 に記載の新生血管特異的ペプチド。
4. 配列番号 12 ～ 17 で示されるアミノ酸配列のいずれかを有するペプチドまたはそのデンドリマーである請求項 1 に記載の新生血管特異的ペプチド。

5. 癌組織に形成される新生血管に選択的に帰巢するペプチドである請求項 1 に記載の新生血管特異的ペプチド。

5 6. 癌が肉腫またはメラノーマである請求項 5 に記載の新生血管特異的ペプチド。

7. 請求項 5 または 6 に記載の新生血管特異的ペプチドの少なくとも 1 種を有効成分として、製剤担体と共に含有する制癌組成物および癌転移抑制組成物。  
10

8. 新生血管特異的ペプチドが配列番号 1、5、6、13～17、19、21、23～25 および 28～32 で示されるアミノ酸配列のいずれかを有するペプチドまたはそのデンドリマーである請求項 7 に記載の制癌組成物および癌転移抑制組成物。  
15

9. 請求項 5 または 6 に記載の新生血管特異的ペプチドの少なくとも 1 種と抗癌剤または癌転移抑制剤とを有効成分として、製剤担体と共に含有するリポソーム製剤。  
20

1 0. 新生血管特異的ペプチドが配列番号 1 5 ~ 1 7  
で示されるアミノ酸配列のいずれかを有するペプチド  
またはそのデンドリマーである請求項 1 0 に記載のリ  
ボソーム製剤。

5

1 1. 請求項 5 または 6 に記載の新生血管特異的ペプ  
チドの少なくとも 1 種の有効量を患者に投与する、制  
癌および癌転移抑制方法。

10 1 2. 新生血管特異的ペプチドが配列番号 1、 5、 6、  
1 3 ~ 1 7、 1 9、 2 1、 2 3 ~ 2 5 および 2 8 ~  
3 2 で示されるアミノ酸配列のいずれかを有するペプ  
チドまたはそのデンドリマーである請求項 1 1 に記載  
の制癌および癌転移抑制方法。

15

1 3. 請求項 9 に記載のリボソーム製剤を患者に投与  
する、制癌および癌転移抑制方法。

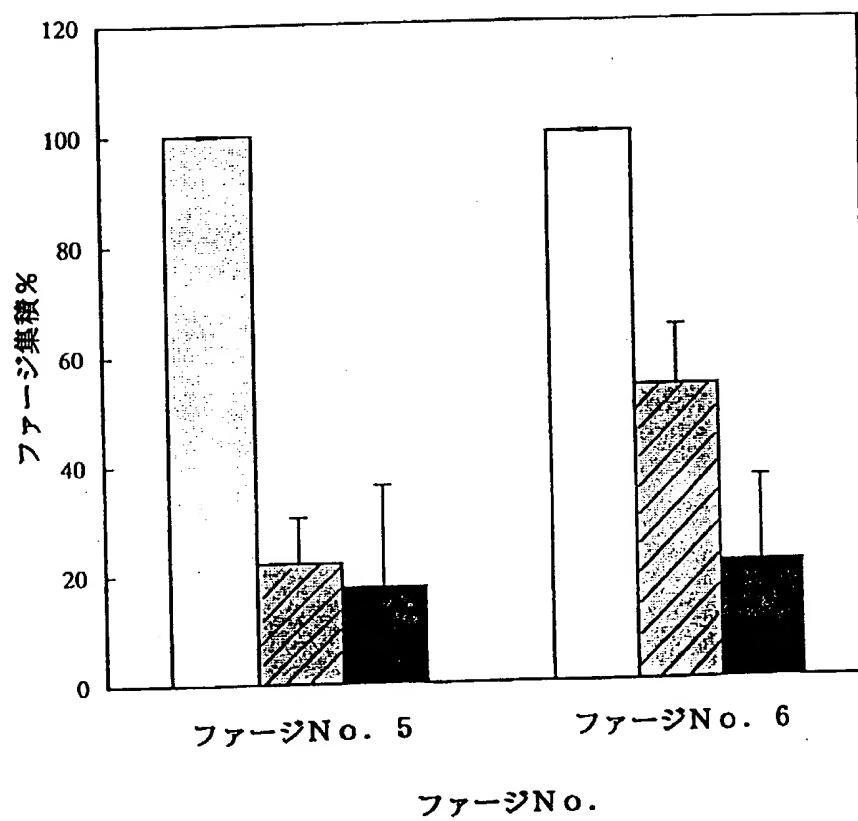
1 4. 請求項 1 0 に記載のリボソーム製剤を患者に投  
与する制癌および癌転移抑制方法。

20



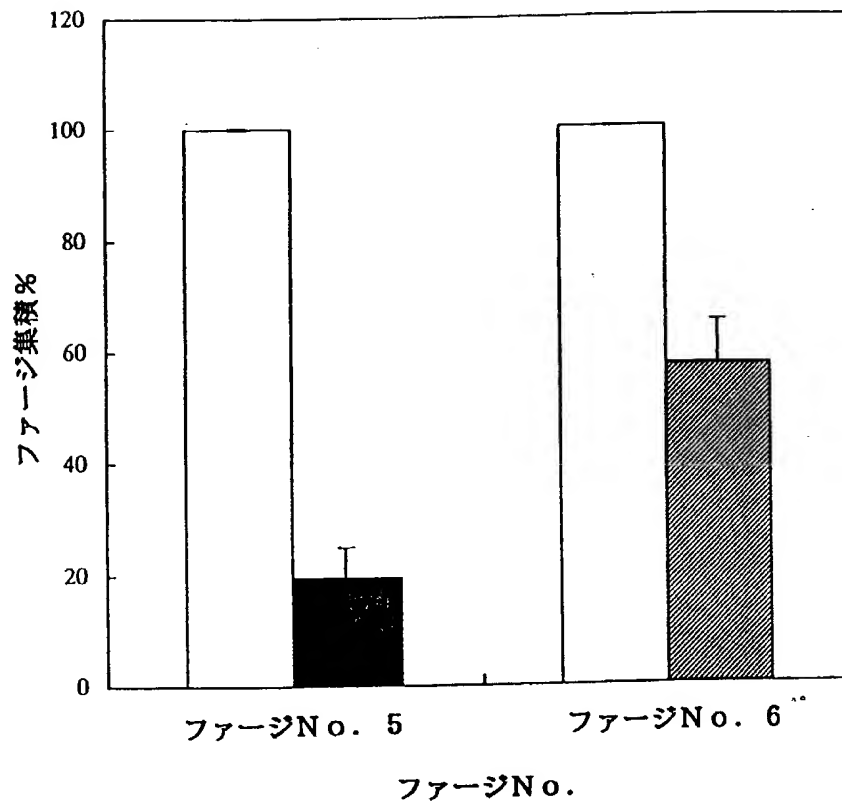
1/15

FIG. 1



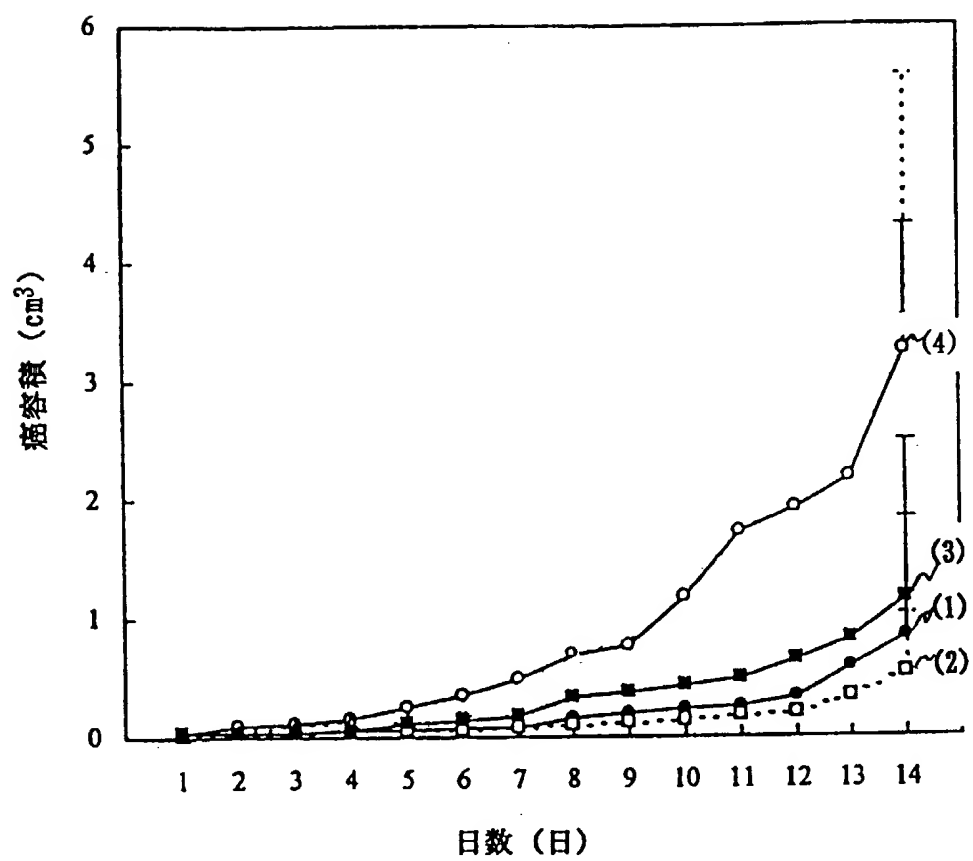
2/15

FIG. 2



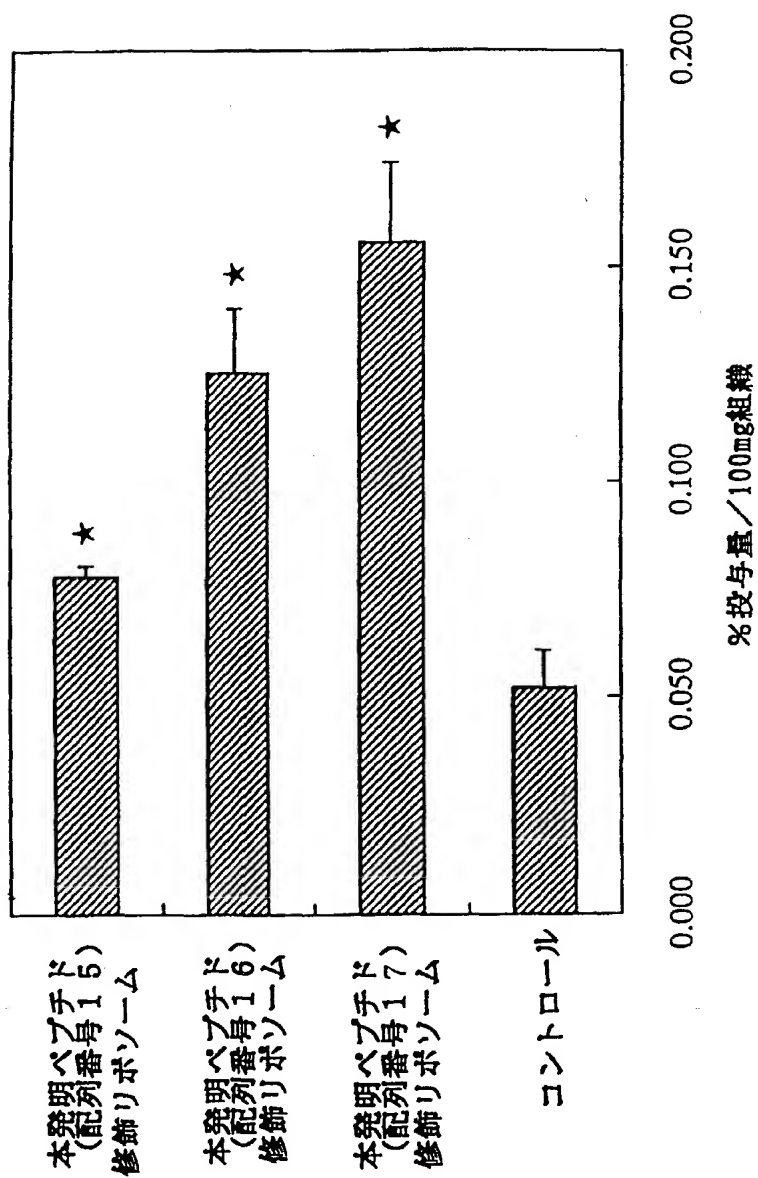
3/15

FIG. 3



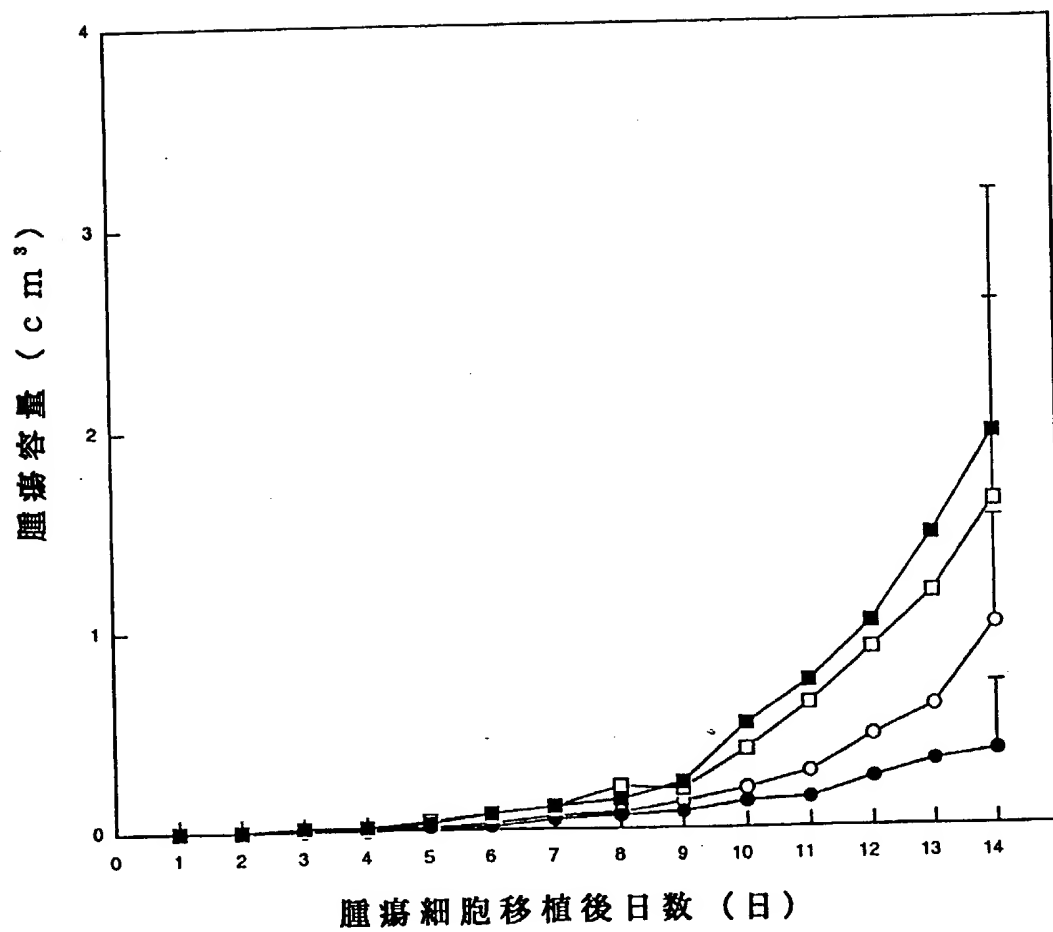
4/15

FIG. 4



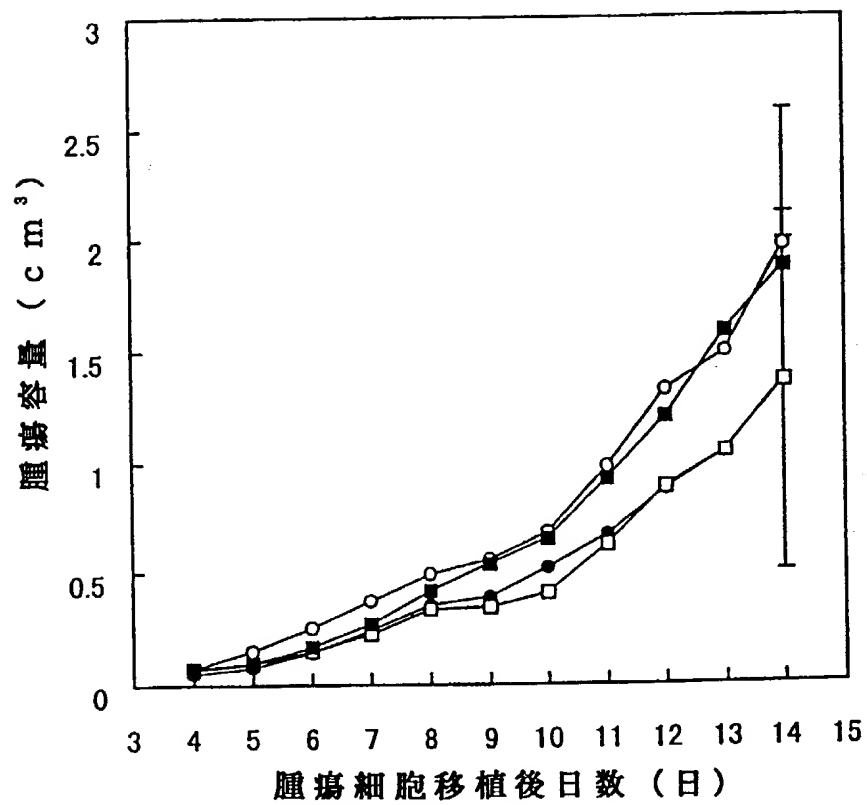
5/15

FIG. 5



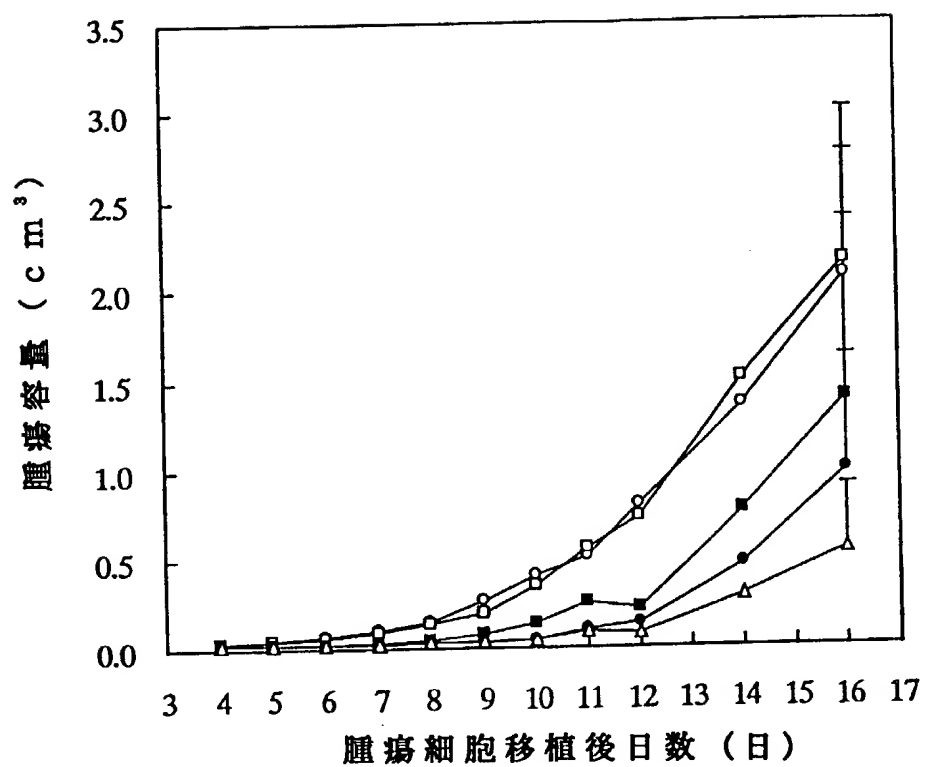
6/15

FIG. 6



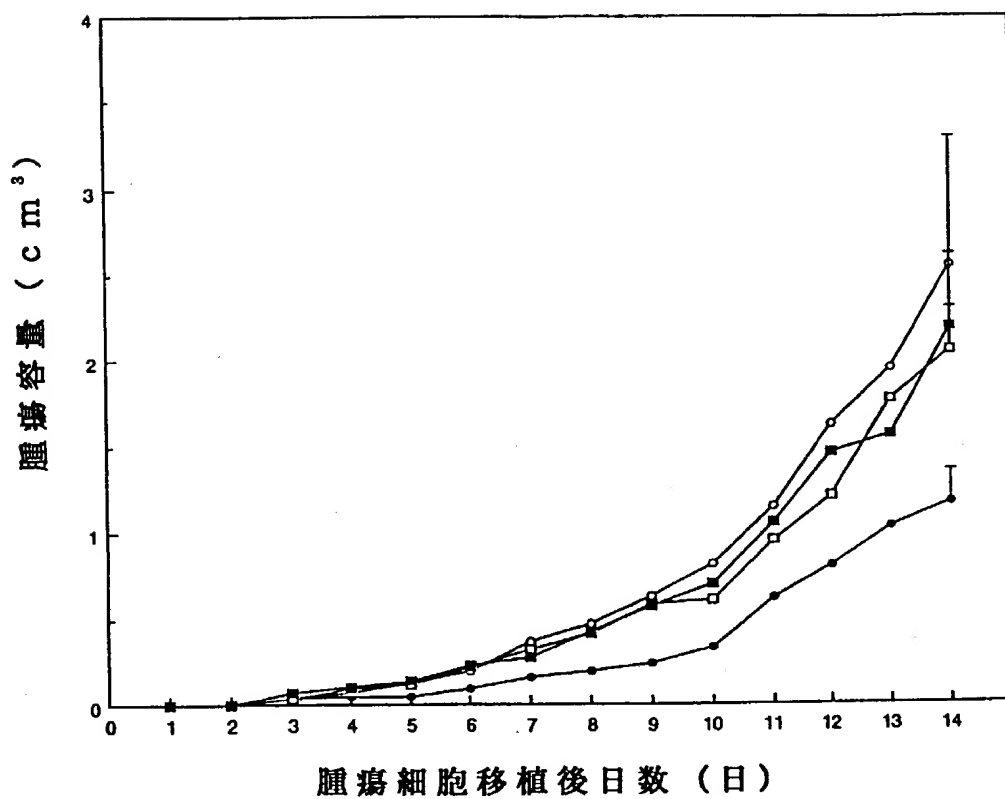
7/15

FIG. 7



8/15

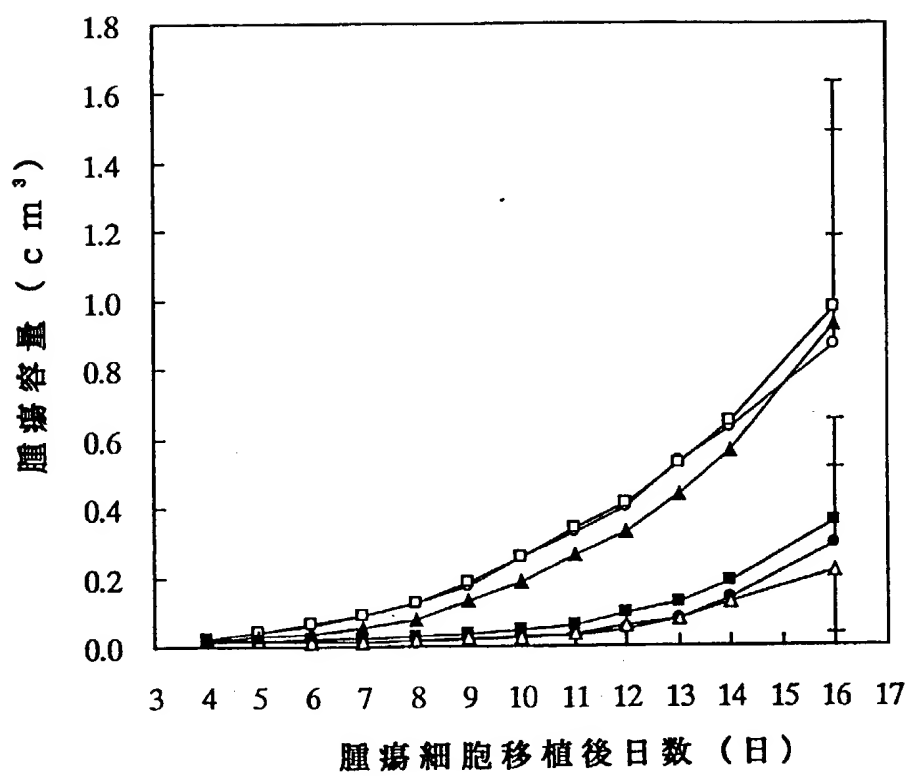
FIG. 8





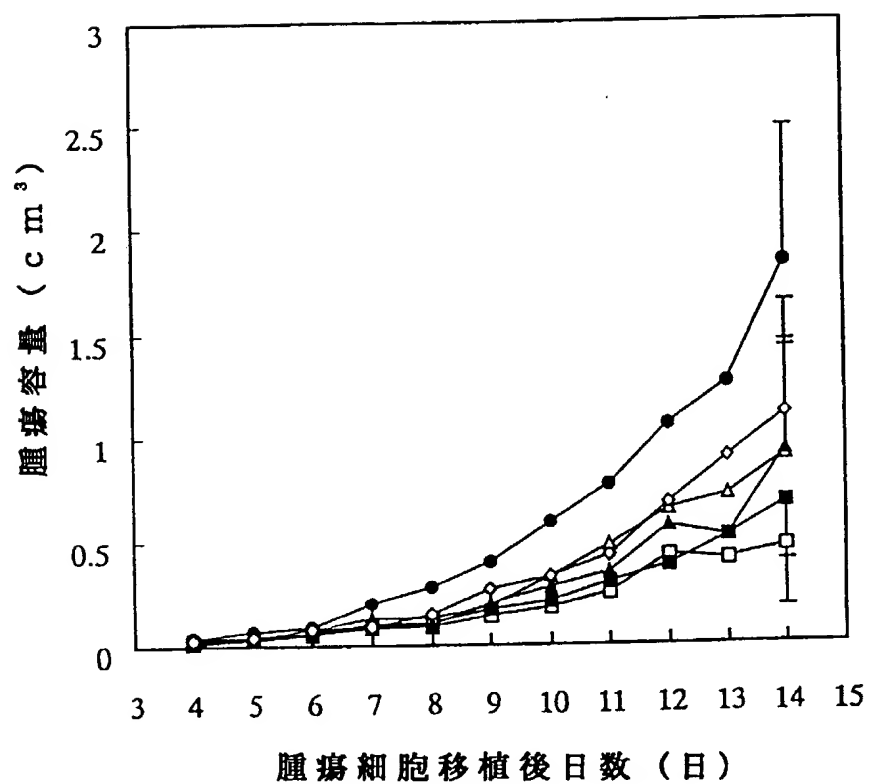
9/15

FIG. 9



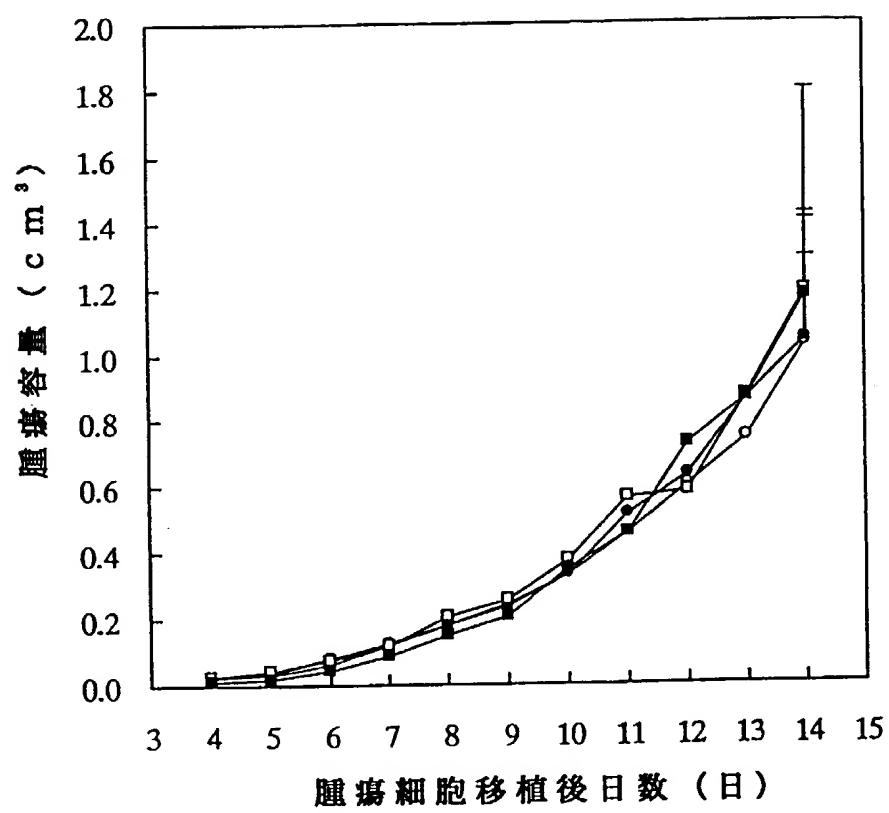
10/15

FIG. 10



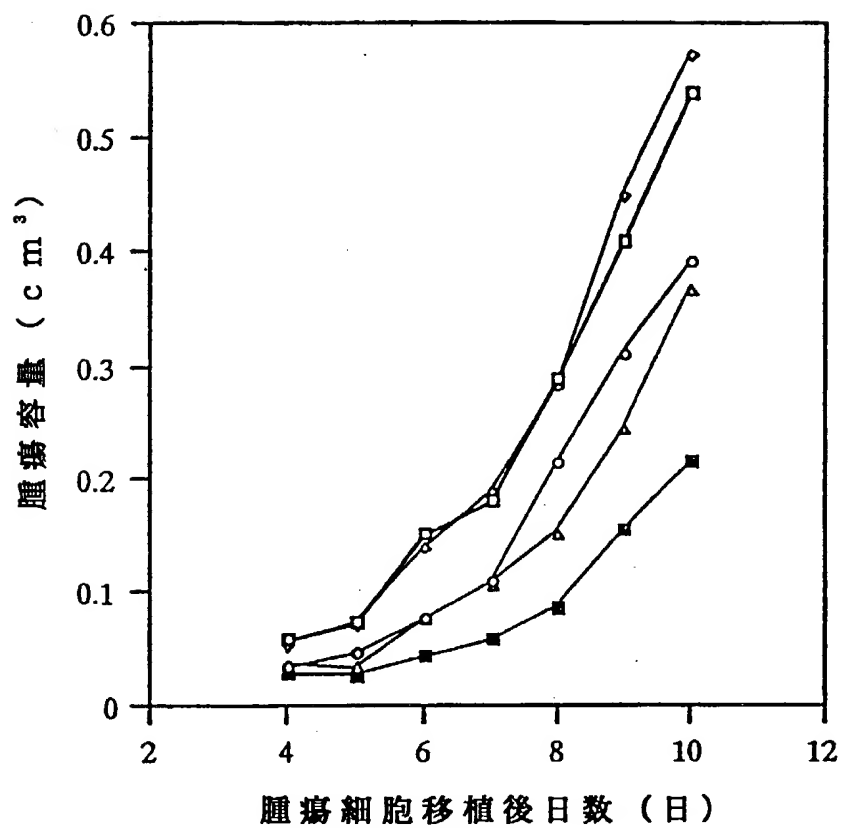
11/15

FIG. 11



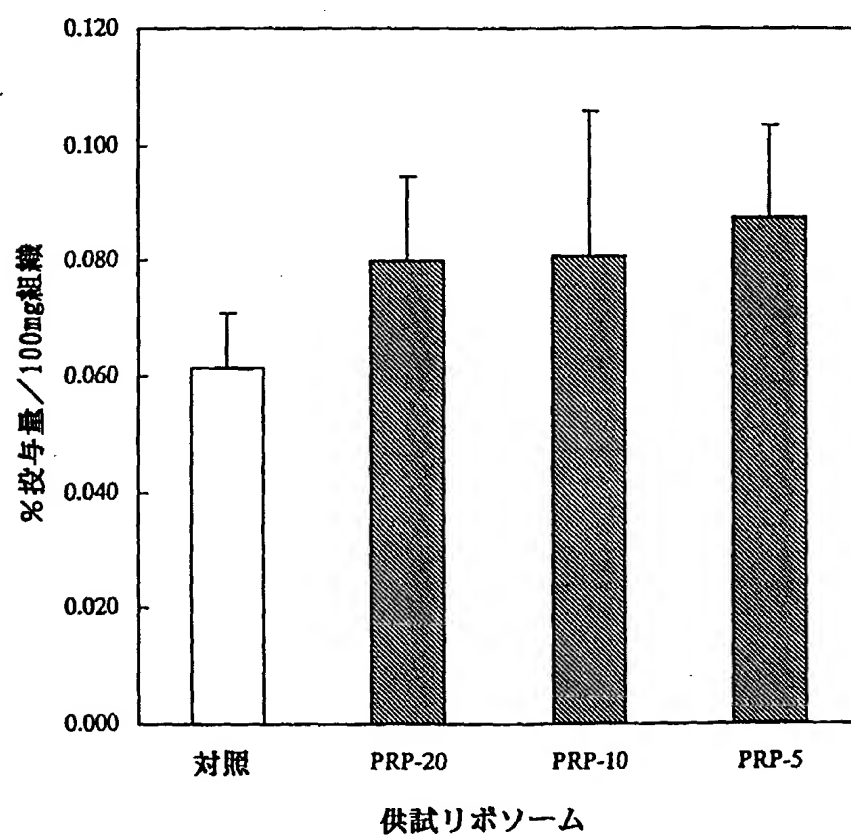
12/15

FIG. 12



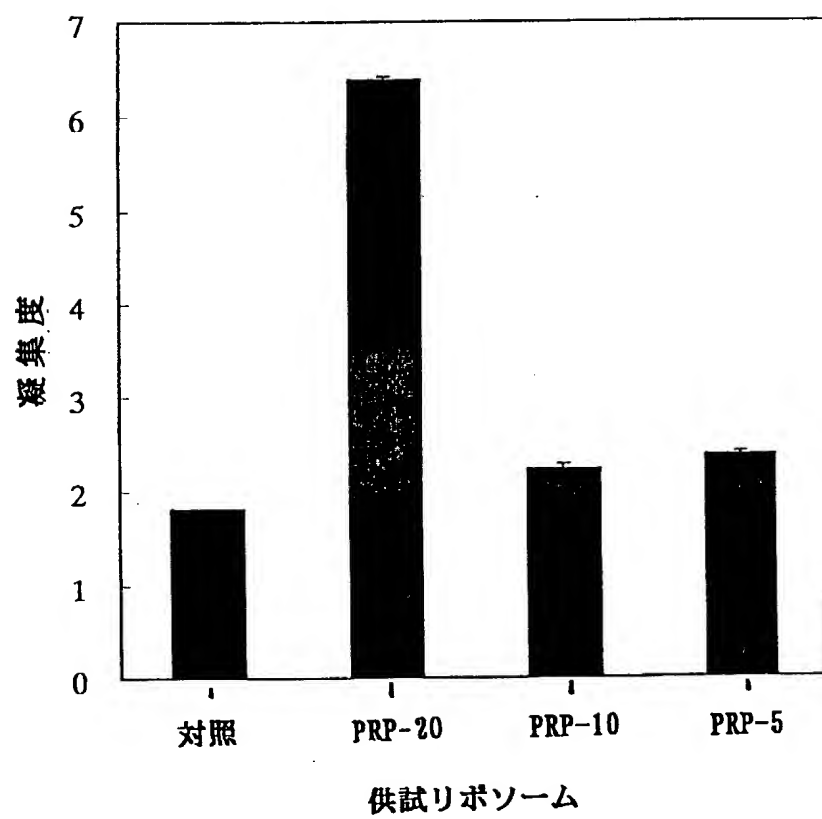
13/15

FIG. 13



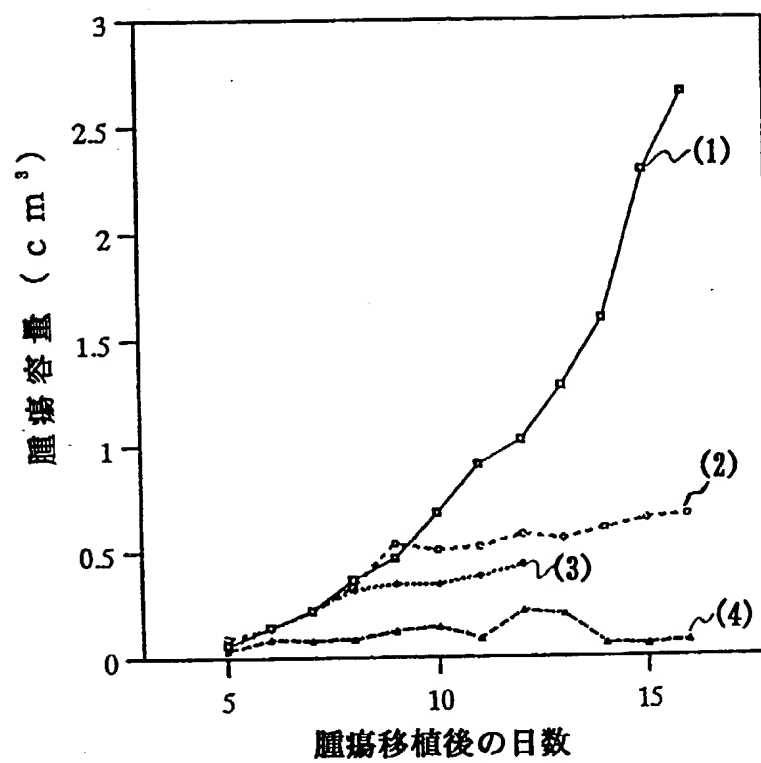
14/15

FIG. 14



15/15

FIG. 15



1/12

## SEQUENCE LISTING

&lt;110&gt; Otsuka Pharmaceutical Co. Ltd.

&lt;120&gt; Affinity peptide to tumor neovascular tissue

&lt;130&gt; P99-47

&lt;140&gt;

&lt;141&gt;

&lt;150&gt; JP H10-295198 and JP H11-194706

&lt;151&gt; 1998-10-16 and 1999-07-08

&lt;160&gt; 35

&lt;170&gt; PatentIn Ver. 2.0

&lt;210&gt; 1

&lt;211&gt; 15

&lt;212&gt; PRT

&lt;213&gt; phage library

&lt;220&gt;

&lt;400&gt; 1

Pro Arg Pro Gly Ala Pro Leu Ala Gly Ser Trp Pro Gly Thr Ser

1

5

10

15

&lt;210&gt; 2

&lt;211&gt; 15

&lt;212&gt; PRT

&lt;213&gt; phage library

&lt;220&gt;

&lt;400&gt; 2

Ala Xaa Glu Trp Leu Asp Ala Leu Phe Val Arg His Val Asp Arg

1

5

10

15



2/12

&lt;210&gt; 3

&lt;211&gt; 15

&lt;212&gt; PRT

&lt;213&gt; phage library

&lt;220&gt;

&lt;400&gt; 3

Ala Ala Glu Trp Leu Asp Ala Phe Phe Val Arg His Val Asp Arg

1

5

10

15

&lt;210&gt; 4

&lt;211&gt; 15

&lt;212&gt; PRT

&lt;213&gt; phage library

&lt;220&gt;

&lt;400&gt; 4

Ala Pro Cys Cys Ser His Leu Asp Ala Ser Pro Phe Gln Arg Pro

1

5

10

15

&lt;210&gt; 5

&lt;211&gt; 15

&lt;212&gt; PRT

&lt;213&gt; phage library

&lt;220&gt;

&lt;400&gt; 5

Asp Arg Trp Arg Pro Ala Leu Pro Val Val Leu Phe Pro Leu His

1

5

10

15

&lt;210&gt; 6

&lt;211&gt; 15

3/12

&lt;212&gt; PRT

&lt;213&gt; phage library

&lt;220&gt;

&lt;400&gt; 6

Ala Ser Ser Ser Tyr Pro Leu Ile His Trp Arg Pro Trp Ala Arg  
1 5 10 15

&lt;210&gt; 7

&lt;211&gt; 15

&lt;212&gt; PRT

&lt;213&gt; phage library

&lt;220&gt;

&lt;400&gt; 7

Arg Ala Ser Asp Val Gly Ser Asp Val Val Pro Arg Tyr Pro Phe  
1 5 10 15

&lt;210&gt; 8

&lt;211&gt; 15

&lt;212&gt; PRT

&lt;213&gt; phage library

&lt;220&gt;

&lt;400&gt; 8

Xaa Phe Ala Arg Ala Pro Val Glu His His Asp Val Val Gly Leu  
1 5 10 15

&lt;210&gt; 9

&lt;211&gt; 15

&lt;212&gt; PRT

&lt;213&gt; phage library

4/12

&lt;220&gt;

&lt;400&gt; 9

Gly Asp Val Trp Leu Phe Leu Thr Ser Thr Ser His Phe Ala Arg

1

5

10

15

&lt;210&gt; 10

&lt;211&gt; 15

&lt;212&gt; PRT

&lt;213&gt; phage library

&lt;220&gt;

&lt;400&gt; 10

Pro Ala Gln Ser Asn Phe Val Thr Trp Gly Tyr Asn Val Ala Val

1

5

10

15

&lt;210&gt; 11

&lt;211&gt; 15

&lt;212&gt; PRT

&lt;213&gt; phage library

&lt;220&gt;

&lt;400&gt; 11

Glu Gly Cys Ser Val Ser Ser Val Gly Ala Leu Cys Thr His Val

1

5

10

15

&lt;210&gt; 12

&lt;211&gt; 8

&lt;212&gt; PRT

&lt;213&gt; phage library

&lt;220&gt;

&lt;400&gt; 12

5/12

Ser Val Ser Ser Val Gly Ala Leu

1 5

&lt;210&gt; 13

&lt;211&gt; 8

&lt;212&gt; PRT

&lt;213&gt; phage library

&lt;220&gt;

&lt;400&gt; 13

Asp Arg Trp Arg Pro Ala Leu Pro

1 5

&lt;210&gt; 14

&lt;211&gt; 8

&lt;212&gt; PRT

&lt;213&gt; phage library

&lt;220&gt;

&lt;400&gt; 14

Ile His Trp Arg Pro Trp Ala Arg

1 5

&lt;210&gt; 15

&lt;211&gt; 5

&lt;212&gt; PRT

&lt;213&gt; phage library

&lt;220&gt;

&lt;400&gt; 15

Arg Trp Arg Pro Ala

1 5

6/12

&lt;210&gt; 16

&lt;211&gt; 5

&lt;212&gt; PRT

&lt;213&gt; phage library

&lt;220&gt;

&lt;400&gt; 16

His Trp Arg Pro Trp

1

5

&lt;210&gt; 17

&lt;211&gt; 5

&lt;212&gt; PRT

&lt;213&gt; phage library

&lt;220&gt;

&lt;400&gt; 17

Ala Pro Arg Pro Gly

1

5

&lt;210&gt; 18

&lt;211&gt; 15

&lt;212&gt; PRT

&lt;213&gt; phage library

&lt;220&gt;

&lt;400&gt; 18

Pro Ser Gly Gly Pro Leu Pro Thr Trp Ala Ala Arg Ser Pro Gly

1

5

10

15

&lt;210&gt; 19

7/12

&lt;211&gt; 12

&lt;212&gt; PRT

&lt;213&gt; phage library

&lt;220&gt;

&lt;400&gt; 19

Ala Asp Gly Ala Pro Arg Pro Gly Ala Pro Leu Ala

1

5

10

&lt;210&gt; 20

&lt;211&gt; 8

&lt;212&gt; PRT

&lt;213&gt; phage library

&lt;220&gt;

&lt;400&gt; 20

Ala Gly Ser Trp Pro Gly Thr Ser

1

5

&lt;210&gt; 21

&lt;211&gt; 8

&lt;212&gt; PRT

&lt;213&gt; phage library

&lt;220&gt;

&lt;400&gt; 21

Pro Val Val Leu Phe Pro Leu His

1

5

&lt;210&gt; 22

&lt;211&gt; 15

&lt;212&gt; PRT

8/12

&lt;213&gt; phage library

&lt;220&gt;

&lt;400&gt; 22

Leu Asp Leu Pro Leu Pro His Arg Pro Phe Val Arg Trp Ala Val

1

5

10

15

&lt;210&gt; 23

&lt;211&gt; 5

&lt;212&gt; PRT

&lt;213&gt; phage library

&lt;220&gt;

&lt;400&gt; 23

Pro Val Val Leu Phe

1

5

&lt;210&gt; 24

&lt;211&gt; 5

&lt;212&gt; PRT

&lt;213&gt; phage library

&lt;220&gt;

&lt;400&gt; 24

Leu Phe Pro Leu His

1

5

&lt;210&gt; 25

&lt;211&gt; 5

&lt;212&gt; PRT

&lt;213&gt; phage library

&lt;220&gt;

9/12

&lt;400&gt; 25

Pro Ala Leu Pro Val

1

5

&lt;210&gt; 26

&lt;211&gt; 8

&lt;212&gt; PRT

&lt;213&gt; phage library

&lt;220&gt;

&lt;400&gt; 26

Ala Ser Ser Ser Tyr Pro Leu Ile

1

5

&lt;210&gt; 27

&lt;211&gt; 15

&lt;212&gt; PRT

&lt;213&gt; phage library

&lt;220&gt;

&lt;400&gt; 27

Ser Ala Tyr Pro Ala Leu Ser Trp Ser His Arg Arg Ile Trp Pro

1

5

10

15

&lt;210&gt; 28

&lt;211&gt; 4

&lt;212&gt; PRT

&lt;213&gt; phage library

&lt;220&gt;

&lt;400&gt; 28

Arg Trp Arg Pro



10/12

1

<210> 29

<211> 4

<212> PRT

<213> phage library

<220>

<400> 29

His Trp Arg Pro

1

<210> 30

<211> 4

<212> PRT

<213> phage library

<220>

<400> 30

Trp Arg Pro Ala

1

<210> 31

<211> 4

<212> PRT

<213> phage library

<220>

<400> 31

Trp Arg Pro Trp

1

11/12

&lt;210&gt; 32

&lt;211&gt; 3

&lt;212&gt; PRT

&lt;213&gt; phage library

&lt;220&gt;

&lt;400&gt; 32

Trp Arg Pro

1

&lt;210&gt; 33

&lt;211&gt; 5

&lt;212&gt; PRT

&lt;213&gt; phage library

&lt;220&gt;

&lt;400&gt; 33

His Ala Arg Pro Trp

1

5

&lt;210&gt; 34

&lt;211&gt; 5

&lt;212&gt; PRT

&lt;213&gt; phage library

&lt;220&gt;

&lt;400&gt; 34

His Trp Ala Pro Trp

1

5

&lt;210&gt; 35

&lt;211&gt; 5

12/12

<212> PRT

<213> phage library

<220>

<400> 35

His Trp Arg Ala Trp

1

5

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP99/05730

<b>A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER</b> Int.Cl <sup>7</sup> C07K14/78, C07K5/068, C07K7/04, C12N15/00, A61K38/10, A61K38/08, A61K 9/127  According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC		
<b>B. FIELDS SEARCHED</b> Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols) Int.Cl <sup>7</sup> C07K14/78, C07K5/068, C07K7/04, C12N15/00, A61K38/10, A61K38/08, A61K9/127  Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched  Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used) CA (STN), REGISTRY (STN)		
<b>C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT</b>		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	WO, 98/49322, A1 (SONDEREGGER), 05 November, 1998 (05.11.98) & AU, 9868491, A	1-10
A	WO, 98/12226, A1 (THE BURNHAM INSTITUTE), 26 March, 1998 (26.03.98) & US, 5922676, A	1-10
TA	WO, 99/54456, A1 (HOECHST MARION ROUSSEL REUTSCHAL AND GMBH), 28 October, 1999 (28.10.99) & EP, 950709, A	1-10
TA	WO, 99/61476, A1 (ABBOTT LABORATORIES), 02 December, 1999 (02.12.99) (Family: none)	1-10
EA	WO, 99/55865, A1 (GENESIS RESEARCH AND DEVELOPMENT CORPORATION LIMITED), 04 November, 1999 (04.11.99) (Family: none)	1-10
<input checked="" type="checkbox"/> Further documents are listed in the continuation of Box C. <input type="checkbox"/> See patent family annex.		
* Special categories of cited documents: "A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance "E" earlier document but published on or after the international filing date "L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified) "O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means "P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed "T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention "X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone "Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art "&" document member of the same patent family		
Date of the actual completion of the international search 19 January, 2000 (19.01.00)		Date of mailing of the international search report 01 February, 2000 (01.02.00)
Name and mailing address of the ISA/ Japanese Patent Office  Facsimile No.		Authorized officer  Telephone No.

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP99/05730

## C (Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
PA	WO, 99/29858, A1 (CHILDREN'S MEDICAL CENTER CORPORATION), 17 June, 1999 (17.06.99) & AU, 9916339, A	1-10
A	Sato TN et al., "Tei-1 and tie-2 defube another class of putative receptor tyrosine kinase genes expressed in early embryonic vascular system", Proc. Natl. Acad. Sci. USA (1993), Vol. 90, No. 20, pages 9355-9358	1-10

# INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP99/05730

## Box I Observations where certain claims were found unsearchable (Continuation of item 1 of first sheet)

This international search report has not been established in respect of certain claims under Article 17(2)(a) for the following reasons:

1. ☒ Claims Nos.: 11-14  
because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority, namely:  
  
The subject matter of claims 11-14 relates to a method for treatment of the human body by therapy, which does not require an international search report by this International Search Authority in accordance with PCT Article 17(2) (a)(i) and Rule 39.1(iv).
2. ☐ Claims Nos.:  
because they relate to parts of the international application that do not comply with the prescribed requirements to such an extent that no meaningful international search can be carried out, specifically:
3. ☒ Claims Nos.: 10  
because they are dependent claims and are not drafted in accordance with the second and third sentences of Rule 6.4(a).  
  
International Search has been made on the assumption that the cited "claim 10" is a mistake for claim 9.

## Box II Observations where unity of invention is lacking (Continuation of item 2 of first sheet)

This International Searching Authority found multiple inventions in this international application, as follows:

1. ☐ As all required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers all searchable claims.
2. ☐ As all searchable claims could be searched without effort justifying an additional fee, this Authority did not invite payment of any additional fee.
3. ☐ As only some of the required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers only those claims for which fees were paid, specifically claims Nos.:
4. ☐ No required additional search fees were timely paid by the applicant. Consequently, this international search report is restricted to the invention first mentioned in the claims; it is covered by claims Nos.:

Remark on Protest ☐ The additional search fees were accompanied by the applicant's protest.  
☐ No protest accompanied the payment of additional search fees.

## 国際調査報告

国際出願番号 PCT/J P 99/05730

## A. 発明の属する分野の分類 (国際特許分類 (IPC))

Int. Cl<sup>7</sup> C07K 14/78, C07K 5/068, C07K 7/04, C12N 15/00, A61K 38/10, A61K 38/08, A61K 9/127

## B. 調査を行った分野

調査を行った最小限資料 (国際特許分類 (IPC))

Int. Cl<sup>7</sup> C07K 14/78, C07K 5/068, C07K 7/04, C12N 15/00, A61K 38/10, A61K 38/08, A61K 9/127I

最小限資料以外の資料で調査を行った分野に含まれるもの

国際調査で使用した電子データベース (データベースの名称、調査に使用した用語)

CA(STN), REGISTRY(STN)

## C. 関連すると認められる文献

引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求の範囲の番号
PA	WO, 98/49322, A1 (SONDEREGGER) 05. 11月. 1998(05. 11. 98) & AU, 9868491, A	1-10
A	WO, 98/12226, A1 (THE BURNHAM INSTITUTE) 26. 3月. 1998(26. 03. 98) & US, 5922676, A	1-10
TA	WO, 99/54456, A1 (HOECHST MARION ROUSSEL REUTSCHAL AND GMBH) 28. 10月. 1999 (28. 10. 99) & EP, 950709, A	1-10

☒ C欄の続きにも文献が列挙されている。☐ パテントファミリーに関する別紙を参照。

## \* 引用文献のカテゴリー

「A」 特に関連のある文献ではなく、一般的技術水準を示すもの

「E」 国際出願日前の出願または特許であるが、国際出願日後に公表されたもの

「L」 優先権主張に疑義を提起する文献又は他の文献の発行日若しくは他の特別な理由を確立するために引用する文献 (理由を付す)

「O」 口頭による開示、使用、展示等に言及する文献

「P」 国際出願日前で、かつ優先権の主張の基礎となる出願

の日の後に公表された文献

「T」 国際出願日又は優先日後に公表された文献であって出願と矛盾するものではなく、発明の原理又は理論の理解のために引用するもの

「X」 特に関連のある文献であって、当該文献のみで発明の新規性又は進歩性がないと考えられるもの

「Y」 特に関連のある文献であって、当該文献と他の1以上の文献との、当業者にとって自明である組合せによって進歩性がないと考えられるもの

「&amp;」 同一パテントファミリー文献

国際調査を完了した日

19. 01. 00

国際調査報告の発送日

01.02.00

国際調査機関の名称及びあて先

日本国特許庁 (ISA/J P)

郵便番号100-8915

東京都千代田区霞が関三丁目4番3号

特許庁審査官 (権限のある職員)

齋藤 真由美

印

4N

9839

電話番号 03-3581-1101 内線 3488

C (続き) 関連すると認められる文献		
引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求の範囲の番号
TA	WO, 99/61476, A1 (ABBOTT LABORATORIES) 2. 12月. 1999 (02. 12. 99) ファミリーなし	1-10
TA	WO, 99/55865, A1 (GENESIS RESEARCH AND DEVELOPMENT CORPORATION LIMITED) 4. 11月. 1999 (04. 11. 99) ファミリーなし	1-10
PA	WO, 99/29858, A1 (CHILDREN'S MEDICAL CENTER CORPORATION) 17. 6月. 1999 (17. 06. 99) & AU, 9916339, A	1-10
A	Sato TN et al., "Tei-1 and tie-2 defube another class of putative receptor tyrosine kinase genes expressed in early embryonic vascular system", Proc. Natl. Acad. Sci. USA (1993) Vol. 90, No. 20, p. 9355-9358	1-10



## 第I欄 請求の範囲の一部の調査ができないときの意見 (第1ページの2の続き)

法第8条第3項(PCT17条(2)(a))の規定により、この国際調査報告は次の理由により請求の範囲の一部について作成しなかった。

1. ☒ 請求の範囲 11-14 は、この国際調査機関が調査することを要しない対象に係るものである。  
つまり、  
請求項11乃至14は、人の身体の治療による処置方法に該当するものであるから、  
PCT17条(2)(a)及びPCT規則39(iv)の規定により、この国際調査機関が調査することを要しない対象に係るものである。
2. ☐ 請求の範囲 は、有意義な国際調査をすることができる程度まで所定の要件を満たしていない国際出願の部分に係るものである。つまり、
3. ☒ 請求の範囲 10 は、従属請求の範囲であってPCT規則6.4(a)の第2文及び第3文の規定に従って記載されていない。  
なお、引用している「請求項10」は、請求項9の誤記であると認めて国際調査を行った。

## 第II欄 発明の単一性が欠如しているときの意見 (第1ページの3の続き)

次に述べるようにこの国際出願に二以上の発明があるとこの国際調査機関は認めた。

1. ☐ 出願人が必要な追加調査手数料をすべて期間内に納付したので、この国際調査報告は、すべての調査可能な請求の範囲について作成した。
2. ☐ 追加調査手数料を要求するまでもなく、すべての調査可能な請求の範囲について調査することができたので、追加調査手数料の納付を求めなかった。
3. ☐ 出願人が必要な追加調査手数料を一部のみしか期間内に納付しなかったため、この国際調査報告は、手数料の納付のあった次の請求の範囲のみについて作成した。
4. ☐ 出願人が必要な追加調査手数料を期間内に納付しなかったため、この国際調査報告は、請求の範囲の最初に記載されている発明に係る次の請求の範囲について作成した。

追加調査手数料の異議の申立てに関する注意

- ☐ 追加調査手数料の納付と共に出願人から異議申立てがあった。  
☐ 追加調査手数料の納付と共に出願人から異議申立てがなかった。